

B126

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
5. Juli 2001 (05.07.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/48184 A2**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C12N 15/00** (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW.
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/13157
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
22. Dezember 2000 (22.12.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
199 62 893.9 23. Dezember 1999 (23.12.1999) DE  
100 51 564.9 18. Oktober 2000 (18.10.2000) DE

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): **BASF-LYNX BIOSCIENCE AG [DE/DE]**; Im Neuenheimer Feld 515, 69120 Heidelberg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): **FISCHER, Achim [DE/DE]**; Rahmengasse 16, 69120 Heidelberg (DE).

(74) Anwalt: **ISENBRUCK, Günter**; Bardehle, Pagenberg, Dost, Altenburg, Geissler, Isenbruck, Theodor-Heuss-Anlage 12, 68165 Mannheim (DE).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR CARRYING OUT THE PARALLEL SEQUENCING OF A NUCLEIC ACID MIXTURE ON A SURFACE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR PARALLELEN SEQUENZIERUNG EINES NUKLEINSÄUREGEMISCHES AN EINER OBERFLÄCHE

(57) Abstract: The invention relates to a method for carrying out the parallel sequencing of at least two different nucleic acids contained in a nucleic acid mixture, whereby: (a) a surface is prepared which comprises islands of nucleic acids of the same type of tertiary nucleic acids; (b) opposite strands of the tertiary nucleic acids GTN are prepared; (c) the GTN are lengthened by one nucleotide, whereby the nucleotide, on the 2'-OH position or on the 3'-OH position, carries a protective group, which prevents an additional lengthening, and the nucleotide carries a molecular group, which enables the identification of the nucleotide; (d) the incorporated nucleotide is identified; (e) the protective group is removed and said molecular group of the incorporated nucleotide is removed or modified, and; (f) step (c) and the following steps are repeated until the desired sequence information has been obtained.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur parallelen Sequenzierung von mindestens zwei verschiedenen in einem Nukleinsäuregemisch enthaltenen Nukleinsäuren, wobei (a) eine Oberfläche bereitgestellt wird, aufweisend Inseln von Nukleinsäuren jeweils gleicher Sorte, tertiäre Nukleinsäuren; (b) Gegenstrände der tertiären Nukleinsäuren, GTN, bereitgestellt werden; (c) die GTN um ein Nukleotid verlängert werden, wobei das Nukleotid an der 2'-OH-Position oder an der 3'-OH-Position eine Schutzgruppe trägt, die eine weitere Verlängerung verhindert, das Nukleotid eine Molekülgruppe trägt, die die Identifikation des Nukleotids ermöglicht; (d) das eingebaute Nukleotid identifiziert wird; (e) die Schutzgruppe entfernt wird und die zur Identifikation verwendete Molekülgruppe des eingebauten Nukleotids entfernt oder verändert wird, und (f) Schritt (c) und nachfolgende Schritte solange wiederholt werden, bis die gewünschte Sequenzinformation erhalten worden ist.

WO 01/48184 A2

BEST AVAILABLE COPY

---

**Verfahren zur parallelen Sequenzierung eines Nukleinsäuregemisches  
an einer Oberfläche**

---

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Festphasen-gestützten parallelen Sequenzierung von mindestens zwei verschiedenen in einem Nukleinsäuregemisch enthaltenen Nuklein-  
10 säuren.

Ein wichtiges Verfahren der biologischen Analytik ist die Sequenzanalyse von Nukleinsäuren. Hier wird die genaue Basenfolge der interessierenden DNA- oder RNA-Moleküle bestimmt. Die Kenntnis dieser Basenfolge erlaubt beispielsweise die Identifikation bestimmter 15 Gene oder Transkripte, also der zu diesen Genen gehörigen Boten-RNA-Moleküle, die Aufdeckung von Mutationen bzw. Polymorphismen, oder auch die Identifikation von Organismen oder Viren, die sich anhand bestimmter Nukleinsäuremoleküle eindeutig erkennen lassen. Üblicherweise wird die Sequenzierung von Nukleinsäuren nach dem Kettenabbruchverfahren durchgeführt (Sanger et al. (1977) PNAS 74, 5463-5467). Hierzu wird eine 20 enzymatische Ergänzung eines Einzelstrangs zum Doppelstrang vorgenommen, indem ein an besagten Einzelstrang hybridisierter "Primer", in der Regel ein synthetisches Oligonukleotid, mittels Zugabe von DNA-Polymerase und Nukleotidbausteinen verlängert wird. Ein geringer Zusatz von Abbruch-Nukleotidbausteinen, welche nach ihrer Inkorporation in den wachsenden Strang keine weitere Verlängerung mehr zulassen, führt zur Akkumulation 25 von Teilsträngen mit bekanntem, durch das jeweilige Abbruchnukleotid festgelegtem Ende. Das so erhaltene Gemisch unterschiedlich langer Stränge wird mittels Gel-ektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Aus den entstehenden Bandenmustern lässt sich die Nukleotidfolge des unbekannten Strangs ableiten. Ein großer Nachteil des genannten Verfahrens besteht im erforderlichen instrumentellen Aufwand, der den erreichbaren 30 Durchsatz an Reaktionen begrenzt. Für jede Sequenzierungsreaktion ist, den Einsatz von mit vier unterschiedlichen Fluorophoren markierten Abbruchnukleotiden vorausgesetzt, mindestens eine Spur auf einem Flachgel oder, beim Einsatz von Kapillarektrophorese, mindestens eine Kapillare erforderlich. Der hierdurch entstehende Aufwand begrenzt auf den derzeit modernsten kommerziell erhältlichen Sequenzierautomaten die Zahl an parallel 35 prozessierbaren Sequenzierungen auf maximal 96. Ein weiterer Nachteil besteht in der Begrenzung der Leselänge", also der Zahl der richtig identifizierbaren Basen pro Sequenzierung, durch die Auflösung des Gelsystems. Ein alternatives Verfahren zur Sequenzierung, die Sequenzbestimmung über Massenspektrometrie, ist schneller und erlaubt daher

- die Prozessierung von mehr Proben in der gleichen Zeit, ist andererseits aber auf verhältnismäßig kleine DNA-Moleküle (beispielsweise 40-50 Basen) beschränkt. Bei noch einer anderen Sequenzierungstechnik, Sequenzierung durch Hybridisierung (SBH, Sequencing By Hybridization; vgl. Drmanac et al., Science 260 (1993), 1649-1652), werden Basenfolgen durch die spezifische Hybridisierung unbekannter Proben mit bekannten Oligonukleotiden identifiziert. Besagte bekannte Oligonukleotide werden hierzu in einer komplexen Anordnung auf einem Träger fixiert, eine Hybridisierung mit der markierten, zu sequenzierenden Nukleinsäure wird vorgenommen, und die hybridisierenden Oligonukleotide werden ermittelt. Aus der Information darüber, welche Oligonukleotide mit der unbekannten Nukleinsäure hybridisiert haben, und aus ihrer Sequenz läßt sich dann die Sequenz der unbekannten Nukleinsäure ermitteln. Ein Nachteil des SBH-Verfahrens ist die Tatsache, daß sich die optimalen Hybridisierungsbedingungen für Oligonukleotide nicht exakt vorhersagen lassen und sich dementsprechend kein großer Satz an Oligonukleotiden entwerfen läßt, die einerseits alle bei ihrer gegebenen Länge möglichen Sequenzvariationen enthalten und andererseits exakt die gleichen Hybridisierungsbedingungen benötigen. Somit kommt es durch unspezifische Hybridisierung zu Fehlern in der Sequenz-Bestimmung. Außerdem kann das SBH-Verfahren nicht für repetitive Regionen zu sequenzierender Nukleinsäuren eingesetzt werden.
- Neben der Analyse der Expressionsstärke bekannter Gene, wie sie durch Dot Blot-Hybridisierung, Northern-Hybridisierung und quantitative PCR möglich ist, sind auch Verfahren bekannt, welche die *de novo*-Identifikation unbekannter zwischen verschiedenen biologischen Proben differentiell exprimierter Gene ermöglichen.
- Eine solche Strategie zur Expressionsanalyse besteht in der Quantifizierung diskreter Sequenzeinheiten. Diese Sequenzeinheiten können in sog. ESTs (Expressed Sequence Tags) bestehen. Werden hinreichende Zahlen von Klonen aus cDNA-Banken, die von miteinander zu vergleichenden Proben stammen, sequenziert, können jeweils identische Sequenzen erkannt und gezählt werden und die erhaltenen relativen Häufigkeiten dieser Sequenzen in den verschiedenen Proben miteinander verglichen werden (vgl. Lee et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92 (1995), 8303-8307). Unterschiedliche relative Häufigkeiten einer bestimmten Sequenz zeigen differentielle Expression des entsprechenden Transkripts an. Allerdings ist das beschriebene Verfahren sehr aufwendig, da bereits für die Quantifizierung der häufigeren Transkripte die Sequenzierung vieler tausend Klone erforderlich ist. Andererseits ist für die eindeutige Identifikation eines Transkripts in der Regel lediglich ein kurzer Sequenzabschnitt von ca. 13-20 Basenpaaren Länge erforderlich. Diese Tatsache wird vom Verfahren des "Serial Analysis of Gene Expression" (SAGE) ausgenutzt (Velculescu et al., Science 270 (1995), 484-487 ). Hier werden kurze Sequenzabschnitte

("Tags") konkateniert, kloniert, und die resultierenden Klone werden sequenziert. Mit einer einzelnen Sequenzreaktion lassen sich auf diese Weise etwa 20 Tags bestimmen. Dennoch ist diese Technik noch nicht sehr leistungsfähig, da bereits für die Quantifizierung der häufigeren Transkripte sehr viele konventionelle Sequenzreaktionen durchgeführt und 5 analysiert werden müssen. Aufgrund des hohen Aufwands ist eine verlässliche Quantifizierung seltener Transkripte mittels SAGE nur sehr schwer möglich.

Ein weiteres Verfahren zur Sequenzierung von Tags nach der US-A 5 695 934 besteht darin, kleine Kugeln mit zu sequenziender Nukleinsäure auf eine solche Weise zu beschichten, daß jede Kugel zahlreiche Moleküle lediglich einer Nukleinsäurespezies erhält. 10 Zur Sequenzierung wird dann das Verfahren des "stepwise ligation and cleavage" eingesetzt, bei dem von einem artifiziellen Linker aus die zu sequenziende Nukleinsäure durch Einsatz eines Typ IIS-Restriktionsenzyms basenweise abgebaut und dabei ihre Sequenz bestimmt wird. Damit eine Beobachtung und Aufzeichnung des Sequenziervorgangs möglich ist, werden die verwendeten Kugeln in eine flachen Küvette eingebracht, die nur wenig höher ist als dem Kugeldurchmesser entspricht, um die Bildung einer einzelnen Lage zu erlauben. Weiterhin müssen die Kugeln in dichtester Packung in der Küvette vorliegen, damit es während des Sequenziervorgangs weder durch den erforderlichen Austausch der Reaktionslösungen noch durch Erschütterungen des Geräts zu einer Veränderung der Kügelanordnung kommt. Obschon sich auf diese Weise viele Sequenziereaktionen auf kleinem Raum durchführen lassen, hat die Anordnung in einer sehr engen Küvette (wenige Mikrometer Höhe) erhebliche Nachteile, da eine gleichmäßige Befüllung der Küvette schwer zu erreichen ist. Ein weiterer Nachteil besteht im hohen apparativen Aufwand des Verfahrens. So muß beispielsweise mit hohen Drücken gearbeitet werden, damit trotz der 15 kleinen Küvettengröße ein effizienter Austausch der notwendigen Reaktionslösungen möglich ist. Noch ein weiterer Nachteil besteht im leichten Verstopfen der Küvette, welches ebenfalls durch die notwendigerweise geringen Maße der Küvette begünstigt wird.

Die bekannten Verfahren zur Nukleinsäureseanalytik weisen einen oder mehrere der folgenden Nachteile auf:

- Sie ermöglichen nur in stark eingeschränkten Umfang die parallelisierte Durchführung von einzelnen Sequenziereaktionen.
- Sie benötigen relativ große Mengen der Nukleinsäure, deren Sequenz bestimmt werden soll.
- 35 - Sie sind nur zur Sequenzbestimmung von kurzen Sequenzabschnitten geeignet und apparativ aufwendig.

Es ist Aufgabe der Erfindung ein Verfahren bereitzustellen, das die Nachteile des Standes der Technik überwindet.

Die erfindungsgemäße Aufgabe wird durch ein Verfahren zur parallelen Sequenzierung von mindestens zwei verschiedenen in einem Nukleinsäuregemisch enthaltenen Nukleinsäuren gelöst, wobei

- (a) eine Oberfläche bereitgestellt wird, aufweisend Inseln von Nukleinsäuren jeweils gleicher Sorte, tertiäre Nukleinsäuren;
- (b) Gegenstränge der tertiären Nukleinsäuren, GTN, bereitgestellt werden;
- 10 (c) die GTN um ein Nukleotid verlängert werden, wobei
  - das Nukleotid an der 2'-OH-Position oder an der 3'-OH-Position eine Schutzgruppe trägt, die eine weitere Verlängerung verhindert,
  - das Nukleotid eine Molekülgruppe trägt, die die Identifikation des Nukleotids ermöglicht;
- 15 (d) das eingebaute Nukleotid identifiziert wird;
- (e) die Schutzgruppe entfernt wird und die zur Identifikation verwendete Molekülgruppe des eingebauten Nukleotids entfernt oder verändert wird, und
- (f) Schritt (c) und nachfolgende Schritte solange wiederholt werden, bis die gewünschte Sequenzinformation erhalten worden ist.

20

Eine spezielle Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens stellt das nachfolgende dar, bei dem im Schritt (a)

- (a1) eine Oberfläche bereitgestellt wird, an welche mindestens Primermoleküle eines ersten Primers und eines zweiten Primers und gegebenenfalls ein Nukleinsäuregemisch umfassend die Nukleinsäuremoleküle, mit welchen beide Primer hybridisieren können, irreversibel immobilisiert worden sind, wobei beide Primer ein Primerpaar bilden;
- 25 (a2) Nukleinsäuremoleküle des Nukleinsäuregemischs mit einem oder mit beiden Primern desselben Primerpaars hybridisiert werden;
- 30 (a3) die irreversibel immobilisierten Primermoleküle komplementär zum Gegenstrang unter Bildung von sekundären Nukleinsäuren verlängert werden;
- (a4) die Oberfläche in einer von Nukleinäuremolekülen, die nicht durch irreversible Immobilisierung an die Oberfläche gebundenen sind, befreiten Form bereitgestellt wird;
- 35 (a5) die sekundären Nukleinsäuren unter Bildung von tertiären Nukleinsäuren amplifiziert werden.

Tertiäre Nukleinsäuren nach Maßgabe des Schritts (a) können bereitgestellt werden, indem man von einer Oberfläche ausgeht, an welche mindestens ein erster Primer und ein zweiter Primer und gegebenenfalls ein Nukleinsäuregemisch umfassend die Nukleinsäuremoleküle, mit welchen beide Primer hybridisieren können, irreversibel immobilisiert worden sind.

- 5 Beide Primer bilden ein Primerpaar, können also an Strang bzw. Gegenstrang der Nukleinsäuremoleküle binden. Wenn die Nukleinsäuremoleküle des Nukleinsäuregemischs an der Oberfläche bereits gebunden sind, dann kann die Hybridisierung in Schritt (a2) durch bloßes Erhitzen und Abkühlen bewirkt werden. Andernfalls müssen die Nukleinsäuremoleküle des Nukleinsäuregemischs in Schritt (a2) mit der Oberfläche in Kontakt gebracht  
10 werden. In diesem Zusammenhang wird auch auf die WO 00/18957 verwiesen.

Eine spezielle Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens stellt das nachfolgende dar, bei dem im Schritt (a1)

eine Oberfläche, an welche mindestens ein Primerpaar bildende Primermoleküle irreversibel immobilisiert wurden, bereitgestellt wird.

- 15 Die einzelnen durchzuführenden Arbeitsschritte lassen sich bei dieser Ausführungsform auch wie folgt wiedergeben:

- Primermoleküle, die mindestens ein Primerpaar bilden, werden an eine Oberfläche irreversibel immobilisiert;
- Nukleinsäuremoleküle werden mit einem oder mit beiden Primern desselben Primerpaars hybridisiert, indem man das Nukleinsäuregemisch mit der Oberfläche in Kontakt bringt;
- die irreversibel immobilisierten Primermoleküle werden komplementär zum Gegenstrang unter Bildung von sekundären Nukleinsäuren verlängert;
- die nicht durch irreversible Immobilisierung an die Oberfläche gebundenen Nukleinäuremoleküle werden von der Oberfläche entfernt;
- die sekundären Nukleinsäuren werden unter Bildung von tertiären Nukleinsäuren amplifiziert;
- Gegenstränge der tertiären Nukleinsäuren, GTN, werden bereitgestellt;
- die GTN werden um ein Nukleotid verlängert, wobei
- 30 • das Nukleotid an der 2'-OH-Position oder an der 3'-OH-Position eine Schutzgruppe trägt, die eine weitere Verlängerung verhindert,
- das Nukleotid trägt eine Molekülgruppe, die die Identifikation des Nukleotids ermöglicht;
- das eingebaute Nukleotid wird identifiziert;
- 35 • die Schutzgruppe wird entfernt und die zur Identifikation verwendete Molekülgruppe des eingebauten Nukleotids wird entfernt oder verändert, und
- der 7. Schritt und die nachfolgende Schritte werden solange wiederholt, bis die gewünschte Sequenzinformation erhalten worden ist.

Bei dem Nukleinsäuregemisch des Schritts (a2) kann es sich zum Beispiel um eine Bibliothek handeln, also um Nukleinsäuremoleküle, die über weite Strecken eine identische Sequenz aufweisen, sich aber in einem Teilbereich inmitten der identischen Bereiche stark unterscheiden. Häufig bestehen die Bibliotheken aus gegebenenfalls linearisierten Plasmiden, in welche verschiedene Nukleinsäurefragmente einkloniert wurden, die später sequenziert werden sollen. Ferner kann es sich bei dem Nukleinsäuregemisch um Restriktionsfragmente handeln, an deren Schnittenden Linkermoleküle gleicher Sequenz ligiert wurden. Hierbei unterscheiden sich in der Regel die Linker, die an das 5'-Ende der Fragmente gebunden werden von den Linkern, die an das 3'-Ende der Fragmente gebunden werden. Jedenfalls ist in der Regel der interessierende Sequenzabschnitt in den Nukleinsäuremolekülen des Nukleinsäuregemischs von zwei flankierenden im wesentlichen bei allen Nukleinsäuremolekülen jeweils identischen Sequenzabschnitten umgeben, von denen mindestens einer der beiden Sequenzabschnitte bevorzugt eine selbstkomplementäre Sequenz aufweist. Der betreffende Sequenzabschnitt besitzt in einzelsträngiger Form eine ausgeprägte Neigung zur Ausbildung einer sogenannten Hairpinstruktur.

Die Primer oder die Primermoleküle in Schritt (a1 bis a3) sind einzelsträngige Nukleinsäuremoleküle einer Länge von etwa 12 bis etwa 60 Nukleotidbausteinen und mehr, die sich im weitesten Sinne für die Verwendung im Rahmen der PCR eignen. Es handelt sich um DNA-Moleküle, RNA-Moleküle oder deren Analoga, die zur Hybridisierung mit einer zumindest über einen Teilbereich komplementären Nukleinsäure bestimmt sind und als Hybrid mit der Nukleinsäure ein Substrat für eine Doppelstrang-spezifische Polymerase darstellen. Bei der Polymerase handelt es sich vorzugsweise um DNA-Polymerase I, T7-DNA-Polymerase, das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I, um Polymerasen, die bei der PCR Anwendung finden, oder auch um eine Reverse Transkriptase.

Das Primerpaar in Schritt (a2) stellt einen Satz von zwei Primern dar, die an Bereiche einer Nukleinsäure binden, die die zu amplifizierende Zielsequenz der Nukleinsäure flankieren und eine „Polarität“ in bezug auf die Orientierung ihrer Bindung an die Nukleinsäure aufweisen, daß eine Amplifikation möglich ist (die 3'-Termini weisen aufeinander zu). Bei diesen Bereichen handelt es sich bevorzugt um Sequenzabschnitte, die bei den Nukleinsäuremolekülen des Nukleinsäuregemisches identisch sind. Zum Beispiel kann es sich bei dem Nukleinsäuregemisch um eine Plasmid-Bibliothek handeln. Die Primer würden dann bevorzugt in dem Bereich der sogenannten Multiple Cloning Site (MCS) binden, und zwar einmal oberhalb und einmal unterhalb der Klonierungsstelle. Ferner könnten die Primer an die Sequenzabschnitte binden, die den Linkern entsprechen, die, wie oben beschrieben, an Restriktionsfragmente beidseitig ligiert wurden. Das erfundungsgemäße Verfahren wird

- bevorzugt mit nur einem Primerpaar durchgeführt, etwa wie das in der US-A 5 641 658 (WO 96/04404) beschriebene Verfahren, in dem auch nur ein Primerpaar eingesetzt wird. Erfnungsgemäß bevorzugt binden die Primer des Primerpaars oder der Primerpaare an Sequenzbereiche, die bei allen oder bei fast allen Nukleinsäuren des Nukleinsäuregemischs
- 5 im wesentlichen identisch sind (sogenannte konservierte Bereiche). Die Primer eines Primerpaars können im übrigen auch dieselbe Sequenz aufweisen. Dies kann dann von Vorteil sein, wenn die konservierten Bereiche, die die zu amplifizierende Sequenz flankieren, Sequenzen aufweisen, die zu einander komplementär sind.
- 10 Einer der Primer eines Primerpaars kann eine Sequenz, die die Ausbildung einer intramolekularen Nukleinsäuredoppelhelix (einer sogenannten Hairpinstruktur) ermöglicht, aufweisen, wobei allerdings ein aus mindestens 13 Nukleotidbausteinen bestehender Bereich des 3'-Terminus ungepaart bleibt.
- 15 Bei der Oberfläche in Schritt (a, a1 und a2, a4) handelt es sich um die zugängliche Fläche eines Körpers aus Kunststoff, Metall, Glas, Silicium oder ähnlich geeigneten Werkstoffen. Vorzugsweise ist diese flach, insbesondere plan ausgestaltet. Die Oberfläche kann eine quellbare Schicht aufweisen, zum Beispiel aus Polysacchariden, Polyzuckeralkoholen oder quellbaren Silikaten.
- 20 Irreversible Immobilisierung meint das Ausbilden von Wechselwirkungen mit der oben beschriebenen Oberfläche, die bei 95°C und der üblichen Ionenstärke bei den PCR-Amplifikationen des Schritts (a5) im Stundenmaßstab stabil sind. Bevorzugterweise handelt es sich dabei um kovalente Bindungen, die auch spaltbar sein können. Bevorzugt werden die Primermoleküle in Schritt (a) über die 5'-Termini irreversibel an der Oberfläche immobilisiert. Alternativ kann eine Immobilisierung auch über ein oder mehrere Nukleotidbausteine, die zwischen den Termini des betreffenden Primermoleküls liegen, immobilisiert werden, wobei allerdings ein Sequenzabschnitt von mindestens 13 Nukleotidbausteinen gerechnet von dem 3'-Terminus ungebunden bleiben muß. Bevorzugt erfolgt die Immobilisierung durch Ausbildung kovalenter Bindungen. Hierbei ist natürlich auf eine entsprechende Belegungsdichte zu achten, die die Kontaktaufnahme der an der Polymerasekettenreaktion beteiligten Primer und Nukleinsäuren ermöglicht. Werden zwei Primer immobilisiert, so sollten die Primer einen mittleren Abstand auf der Oberfläche haben, der zumindest größenumordnungsmäßig mit der maximalen Länge bei vollständiger Streckung
- 25 der zu amplifizierenden Nukleinsäuremoleküle übereinstimmt oder aber kleiner ist. Hierbei ist im wesentlichen zu verfahren, wie in US-A 5 641 658 oder WO 96/04404 beschrieben.
- 30
- 35

- Aus dem Stand der Technik sind Verfahren bekannt, chemisch geeignet derivatisierte Oligonukleotide an Glasoberflächen zu binden. Besonders geeignet sind hierzu beispielsweise endständige, über einen mehratomigen Spacer an das 5'-Ende des Oligonukleotids gebundene primäre Aminogruppen ("Aminolink"), welche leicht im Zuge der Oligonukleotidsynthese inkorporiert werden können und gut mit Isothiocyanat-modifizierten Oberflächen reagieren können. Beispielsweise beschreiben Guo et al. (Nucleic Acids Res. 22 (1994), 5456-5465) ein Verfahren, Glasoberflächen mit Aminosilan und Phenylendiisothiocyanat zu aktivieren und anschließend 5'-aminomodifizierte Oligonukleotide hieran zu binden. Besonders geeignet ist die Carbodiimid-vermittelte Bindung 5'-phosphorylierter Oligonukleotide an aktivierte Polystyrolträger (Rasmussen et al., Anal. Biochem 198 (1991), 138-142). Ein anderes bekanntes Verfahren nutzt die hohe Affinität von Gold für Thiolgruppen zur Bindung von Thiol-modifizierten Oligonukleotiden an Goldoberflächen aus (Hegner et al, FEBS Lett 336 (1993), 452-456).
- Der Begriff sekundäre Nukleinsäure in Schritt (a3) bezeichnet diejenigen Nukleinsäuremoleküle, die durch komplementäre Verlängerung von Primermolekülen entstehen, wobei die Verlängerung komplementär zu den Nukleinsäuremolekülen des Schritts (a2) erfolgt, die mit den Primern hybridisiert wurden.
- Die Oberfläche wird in einer von Nukleinsäuremolekülen, die nicht durch irreversible Immobilisierung an die Oberfläche gebundenen sind, befreiten Form bereitgestellt [Schritt (a4)]. Sofern die Nukleinsäuremoleküle aus Schritt (a1) in Schritt (a1) an die Oberfläche bereits irreversibel immobilisiert worden sind, werden in Schritt (a2) in der Regel keine Nukleinsäuremoleküle mit der Oberfläche in Kontakt gebracht. Folglich müssen sie in den nachfolgenden Schritten auch nicht entfernt werden. Wenn in Schritt (a2) Nukleinsäuremoleküle zwecks Hybridisierung mit den Primern mit der Oberfläche in Kontakt gebracht werden, etwa weil die Nukleinsäuremoleküle nicht schon in Schritt (a1) an die Oberfläche irreversibel immobilisiert worden sind, dann können diese in Schritt (a4) durch Denaturierung und Waschen entfernt werden. Es ist möglich, jedoch nicht bevorzugt, die Entfernung der vorgenannten Nukleinsäuremoleküle erst nach Durchlaufen eines oder mehrerer Amplifikationszyklen des Schritts (a5) vorzunehmen.

Der Begriff tertiäre Nukleinsäuren bezeichnet sekundäre Nukleinsäuren sowie diejenigen Nukleinsäuremoleküle, die aus den sekundären Nukleinsäuren nach dem Verfahren der Polymerasekettenreaktion im Schritt (a5) gebildet werden. Hierbei ist es wichtig, daß Oberfläche und der die Oberfläche umgebende flüssige Reaktionsraum frei von zu amplifizierenden Nukleinsäuren sind, die nicht irreversibel an die Oberfläche immobilisiert sind. Durch die Amplifikation entstehen in der Regel regelrechte Inseln, das heißt diskrete Be-

reiche auf der Oberfläche, die tertiäre Nukleinsäuren der gleichen Sorte, das heißt identische oder hierzu komplementäre Nukleinsäuremoleküle, tragen.

In Schritt (b) werden Gegenstränge der tertiären Nukleinsäuren (GTN) bereitgestellt. Dies 5 kann zum Beispiel durch eine von drei Maßnahmen geschehen, die im folgenden aufgeführt werden:

- Zum einen können in Schritt (a1) Primermoleküle oder gegebenenfalls in Schritt 10 (a1 oder a2) Nukleinsäuremoleküle (des Nukleinsäuregemischs) mit flankierenden Sequenzabschnitten verwendet werden, die selbstkomplementäre Bereiche aufweisen und somit zur intramolekularen Basenpaarung in der Lage sind, was sich in einer sogenannten Hairpinstruktur äußert (siehe auch Fig. 3: Ligation von „maskierten Hairpins“ in Form doppelsträngiger Linkermoleküle). Hierbei ist bevorzugt nur ein Primer eines Primerpaars oder nur ein flankierender Sequenzabschnitt von zweien zur Ausbildung einer Hairpinstruktur in der Lage, um sicherzustellen, daß 15 der Einbau von Nukleotiden nur an einem von zwei komplementären Nukleinsäuremolekülen erfolgt, so daß eine Interferenz der Sequenzsignale beider Nukleinsäuremoleküle ausgeschlossen ist.

Die in Schritt (a5) gebildeten tertiären Nukleinsäuren weisen dann im einzelsträngigen Zustand, der durch Entfernung eines der beiden Stränge unter denaturierenden Bedingungen herbeigeführt wird, in der Nähe ihres 3'-Terminus eine Rückfaltung 20 in Form eines Hairpins auf. Bevorzugterweise reicht der doppelsträngige Anteil des Hairpins bis einschließlich zur letzten Base des 3'-Endes, so daß besagter Hairpin unmittelbar als Substrat für eine zur Sequenzierung eingesetzte Polymerase dienen kann. Dies ist durch geeignete Wahl der Sequenz der Primermoleküle bzw. 25 der die Nukleinsäuremoleküle flankierenden Sequenzabschnitte zu gewährleisten.

- Zweitens können GTN in Form von Hairpins durch Ligation von Oligonukleotiden 30 bereitgestellt werden, die zur Hairpinbildung befähigt sind und gegebenenfalls (aber nicht notwendigerweise) bereits in Gestalt von Hairpins zur Ligation eingesetzt werden (siehe auch Fig. 2). Dies kann so geschehen, daß die tertiären Nukleinsäuren im doppelsträngigen (das heißt nicht denaturiertem) Zustand geschnitten und auf diese Weise einseitig von der Oberfläche abgetrennt werden. Bevorzugterweise geschieht dies durch Inkubation mit einer Restriktionsendonuklease, welche in genau einer der aus einem der beiden Primer stammenden Sequenzen 35 (Primersequenzen) oder in einer an diese Primersequenzen angrenzenden Sequenzen eine Erkennungsstelle aufweist. Nach erfolgtem Restriktionsschnitt ragt dann ein freies Ende der tertiären Nukleinsäuren in den Lösungsraum, welches je nach verwendeter Restriktionsendonuklease ein überhängendes Ende voraussagbarer Se-

quenz besitzt und an welches das Oligonukleotid hybridisiert und ligiert werden kann. Besonders geeignet wäre hierfür ein Oligonukleotid, welches bereits eine Hairpinstruktur ausgebildet hat, demnach also partiell doppelsträngig vorliegt, und einen zum freien Ende der tertiären Nukleinsäuren komplementären Überhang besitzt. Um zu gewährleisten, daß eine Ligation ausschließlich an den irreversibel immobilisierten Strang des Doppelstrangs der tertiären Nukleinsäuren stattfindet, kann das 5'-Ende des Oligonukleotids eine Phosphatgruppe tragen, während das 3'-Ende des irreversibel immobilisierten Strangs sowie das 5'-Ende des mit diesem hybridisierten Gegenstrangs eine OH-Gruppe aufweisen (siehe Fig. 2, Schritte 1 und 2). Nach erfolgter Ligation wird der nicht irreversibel immobilisierte Strang der tertiären Nukleinsäuren unter denaturierenden Bedingungen entfernt. Alternativ hierzu könnte auch, wie in der US-A 5 798 210 vorgeschlagen (siehe dort insbesondere Fig. 7), eine Ligation eines zum Hairpin rückgefalteten Oligonukleotids an den einzelsträngig vorliegenden immobilisierten Strang der tertiären Nukleinsäuren vorgenommen werden. Problematisch ist bei dieser zweiten Maßnahme, daß eine oft beobachtete unzureichende Effizienz des Ligationsschritts vor der Sequenzierung nicht mehr wie bei der ersten Maßnahme durch Amplifikationsschritte kompensiert werden kann. Dies kann dann eine zu geringe Signalstärke bei der nachfolgenden Sequenzierung zur Folge haben.

Drittens ist es auch möglich, Oligonukleotide, die nicht zur Ausbildung einer Hairpinstruktur in der Lage sind, mit den tertiären Nukleinsäuren unter Ausbildung von GTN zu hybridisieren (vgl. US-A 5 798 210, Fig. 8). Diese Alternative käme jedenfalls nur dann in Frage, wenn in Schritt (e), in welchem die Schutzgruppe entfernt wird, Bedingungen gewählt werden, die nicht zur Denaturierung, das heißt nicht zur Aufschmelzung der Doppelstränge, bestehend aus ggf. verlängerten Oligonukleotiden und tertiären Nukleinsäuren, führen. Wird in Schritt (e) unter denaturierenden Bedingungen gearbeitet (z.B. durch Einsatz stärkerer Basen), wird man vorzugsweise auf die anderen Maßnahmen zurückgreifen.

Im Rahmen der beschriebenen Maßnahmen spielt die Länge der Oligonukleotide eine untergeordnete Rolle. In der Regel werden die Oligonukleotide eine Länge von kleiner 100 oder von kleiner 50 Nukleotidbausteinen aufweisen, so daß man auch allgemein von Nukleinsäuren (hier: polymere Nukleotide, die mehr als drei Nukleotidbausteine umfassen) sprechen kann. Einzelsträngige Oligonukleotide einer Länge von größer 45 Nukleotidbausteinen sind infolge unspezifischer Wechselwirkungen nur schwer handhabbar, wenn sie keine Sequenz aufweisen, die Hairpins ermöglicht. Durch die Fähigkeit, Hairpins auszubilden, werden unspezifische Wechselwirkungen durch Kompetition vermindert. Werden

doppelsträngige Oligonukleotide eingesetzt, dann spielt folglich die Länge der Oligonukleotide kaum eine Rolle (siehe auch Fig. 3).

Alle beschriebenen Maßnahmen haben zur Folge, daß die tertiären Nukleinsäuren einen doppelsträngigen Teilbereich aufweisen, der eine Strangverlängerung an den Gegensträngen der tertiären Nukleinsäuren (GTN) durch eine DNA-Polymerase oder Reverse Transkriptase ermöglicht.

Bei dem Nukleotid, das in Schritt (c) komplementär zum Gegenstrang eingebaut wird, handelt es sich um ein entschützbares Abbruchnukleotid. Geeignete Abbruchnukleotide sind zum Beispiel aus US-A 5 798 210 bekannt. Canard und Sarfati (Gene 148 (1994) 1-6) beschreiben 3'-veresterte Nukleotide, welche ein zusammen mit der Schutzgruppe abspaltbares Fluorophor enthalten. Diese Nukleotidbausteine können mit allerdings niedriger Effizienz von verschiedenen Polymerasen in einen wachsenden Strang inkorporiert werden und wirken dann als Abbruchnukleotide, lassen also keine weitere Strangverlängerung zu. Die beschriebenen Ester lassen sich alkalisch oder enzymatisch abspalten, so daß freie, weitere Nukleotidinkorporation erlaubende 3'-OH-Gruppen entstehen. Die Esterspaltung erfolgt allerdings sehr langsam (innerhalb von 2 Stunden), so daß die beschriebenen Verbindungen für eine Sequenzierung längerer DNA-Abschnitte (z.B. mehr als 20 Basen) ungeeignet sind. Solange die Schutzgruppe in 3'-OH oder gegebenenfalls 2'-OH-Position (siehe unten) gebunden ist, stellt die um dieses Nukleotid verlängerte quartäre Nukleinsäure kein Substrat mehr für eine Nukleinsäurepolymerase dar. Erst die Entfernung der Schutzgruppe in Schritt (e) macht eine weitere Verlängerung der quartären Nukleinsäure möglich. Die Schutzgruppe trägt außerdem in der Regel eine Molekülgruppe, die die Identifikation des eingebauten Nukleotids und so die Sequenzierung des wachsenden Nukleinsäurestranges ermöglicht und das Nukleotid mit der Abspaltung der Schutzgruppe verläßt. Allerdings kann die identifizierende Molekülgruppe auch an einer anderen Stelle des Nukleotids, zum Beispiel an der Base, gebunden sein. In diesem Fall ist es notwendig, nach Schritt (d) in Schritt (e) das Signal der identifizierenden Molekülgruppe zu löschen. Dies kann in der Regel auf zwei Arten erfolgen. Zum Beispiel im Falle eines Fluorophors kann die Molekülgruppe durch Ausbleichen verändert werden. Daneben kann die identifizierende Molekülgruppe auch entfernt werden, zum Beispiel durch photochemische Spaltung einer photolabilen Bindung.

Ist die identifizierende Molekülgruppe nicht mit der Schutzgruppe verbunden und wird die identifizierende Molekülgruppe zur Signallöschung abgespalten, so ist die Bindung von Schutzgruppe an das Nukleotid und die Bindung von der identifizierenden Molekülgruppe an das Nukleotid vorzugsweise so zu wählen, daß beide Gruppen in einem Reaktionsschritt abgespalten werden können.

- Bevorzugt trägt jeder der für den Einbau in Frage kommenden vier Nukleotidbausteine (G, A, T, C) eine andere identifizierende Molekülgruppe. In diesem Fall können die vier Sorten Nukleotide in Schritt (c) gleichzeitig angeboten werden. Tragen verschiedene oder sogar alle Nukleotide dieselbe identifizierende Molekülgruppe, so ist Schritt (c) in der Regel vier Teilschritte zu zerlegen, in welchen die Nukleotide einer Sorte (G, A, T, C) getrennt angeboten werden.
- Bei der Molekülgruppe handelt es sich zum Beispiel um einen Fluorophor oder um einen Chromophor. Letzterer könnte sein Absorptionsmaximum im sichtbaren oder im infraroten Frequenzbereich haben. Die in Schritt (d) erfolgende Detektion erfolgt sowohl orts- als auch zeitaufgelöst, so daß die auf der Oberfläche befindlichen Inseln quartärer Nukleinsäuren parallel sequenziert werden können.
- Als Schutzgruppe des Nukleotids in Schritt (c) ist ein chemischer Substituent zu verstehen, welcher die weitere Strangverlängerung nach Einbau des Nukleotids an dessen 3'-Position verhindert. Dabei kann die Schutzgruppe die zu schützende 3'-Position besetzen, also mit dem C-3 der Ribose verbunden sein oder die zu schützende 3'-Position abschirmen und so die Strangverlängerung sterisch behindern. Im letzteren Fall würde die Schutzgruppe in benachbarter Position, insbesondere am C-2 der Ribose mit dem Nukleotid verbunden werden.
- In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden in Schritt (a1) Primer oder Nukleinsäuremoleküle mit flankierenden Sequenzabschnitten verwendet, die selbstkomplementäre Bereiche aufweisen.
- In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden in Schritt (b) die tertiären Nukleinsäuren durch eine Restriktionsendonuklease geschnitten, bevor an die auf diese Weise generierten Enden Oligonukleotide, die zur Ausbildung einer Hairpinstruktur fähig sind, ligiert werden. Es wird auf die Erläuterungen zu Schritt (b), Maßnahme 2 auf Seite 9 verwiesen, insbesondere auf die Erklärung des Begriffs Oligonukleotid.
- In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens sind die zur Ausbildung einer Hairpinstruktur befähigten Oligonukleotide einzelsträngig. Einzelsträngig meint hier nicht durchgängig doppelsträngig. Die Oligonukleotide liegen also nicht als Heterodimer vor. Dies ist zum Beispiel bei Fig. 2 der Fall.
- In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens sind die zur Ausbildung einer Hairpinstruktur befähigten Oligonukleotide doppelsträngig. Die Oligonukleotide liegen also als Heterodimer vor. Dies ist zum Beispiel bei Fig. 3 der Fall.

- In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden in Schritt (b) einzelsträngige Oligonukleotide, die zur Ausbildung einer Hairpinstruktur fähig sind, an tertiäre Nukleinsäuren hybridisiert, bevor tertiäre Nukleinsäuren und vorgenannte einzelsträngige Oligonukleotide ligiert werden. Dies ist zum Beispiel bei Fig. 2 der Fall.
- Dabei ist jedoch zu beachten, daß die Hybridbildung häufig instabil ist (z.B., wenn aus 4 Nukleotidbausteinen bestehende Überhänge hybridisiert werden), so daß Hybridbildung und Ligation unmittelbar aufeinander folgen. In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden in Schritt (b) einzelsträngige Oligonukleotide, die zur Ausbildung einer Hairpinstruktur fähig sind, mit tertiären Nukleinsäuren durch Ligation verknüpft. Hierbei kommt auch die Ligation nicht-überhängender Enden (*blunt ends*) in Frage. Diese setzt keine vorausgegangene Hybridbildung voraus.
- In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden in Schritt (a, a1) die Primermoleküle durch Ausbildung einer kovalenten Bindung an eine Oberfläche irreversibel immobilisiert.
- In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens trägt in Schritt (c) die Base die Molekülgruppe, die die Identifikation des Nukleotids ermöglicht.
- In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens weist die Schutzgruppe eine spaltbare Ester-, Ether-, Anhydrid- oder Peroxid-Gruppe auf.
- In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Schutzgruppe über eine Sauerstoff-Metall-Bindung mit dem Nukleotid verbunden.
- In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt in Schritt (e) die Entfernung der Schutzgruppe durch ein komplexbildendes Ion, vorzugsweise durch Cyanid, Thiocyanat, Fluorid oder Ethylendiamintetraacetat.
- In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens weist die Schutzgruppe in Schritt (c) einen Fluorophor auf und in Schritt (d) wird das Nukleotid fluorometrisch identifiziert.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird in Schritt (e) die Schutzgruppe photochemisch abgespalten.

Die Erfindung wird durch die Zeichnung näher beschrieben, wobei die Zeichenblätter mit 5 fortlaufenden Ziffern versehen sind (1/10 bis 10/12).

Es zeigt

- Fig. 1 die Amplifikation einzelner Nukleinsäuremoleküle mittels Oberflächengebundener Primer zu Inseln aus jeweils identischen amplifizierten Nukleinsäuremolekülen, umfassend ein Zeichenblatt (1/12);  
10 Fig. 2 die Sequenzierung Oberflächen-gebundener Amplifikationsprodukte, umfassend Fig. 2a, Fig. 2b, Fig. 2c, auf den Zeichenblättern 2/12 bis 4/12;  
Fig. 3 die Bereitstellung eines GTN durch Ausbildung einer Hairpinstruktur in Sequenzabschnitten, die Linkern entstammen, umfassend Fig. 3a, Fig. 3b, Fig. 3c auf den Zeichenblättern 5/12 bis 7/12;  
15 Fig. 4 die parallele Sequenzierung an einer Oberfläche, umfassend ein Zeichenblatt (8/12);  
Fig. 5 die Assemblierung der Detektions- und Identifikationsergebnisse zu zusammenhängenden Sequenzen, umfassend ein Zeichenblatt (9/12);  
Fig. 6 die Bereitstellung primärer Nukleinsäuren zur Anwendung in der Expressionsanalyse, umfassend ein Zeichenblatt (10/12);  
20 Fig. 7 die Bereitstellung primärer Nukleinsäuren zur Sequenzierung genomicscher Klone, umfassend ein Zeichenblatt (11/12);  
Fig. 8 das Ergebnis der Amplifikation einzelner Nukleinsäuremoleküle gemäß Fig. 1, umfassend ein Zeichenblatt (12/12).

25

Fig. 1 zeigt die Amplifikation einzelner Nukleinsäuremoleküle mittels Oberflächengebundener Primer zu Inseln aus jeweils identischen amplifizierten Nukleinsäuremolekülen, wobei im einzelnen

- 30 1 die irreversible Immobilisierung von ein Primerpaar bildenden Oligonukleotiden,  
2 die Hybridisierung der primären Nukleinsäuren mit den Oberflächen-gebundenen Primern,  
3 die Bildung sekundärer Nukleinsäuren durch Strangverlängerung der Primer,  
35 4 die Entfernung der nicht irreversibel gebundenen primären Nukleinsäuremoleküle und Amplifikation der sekundären Nukleinsäuren,  
5 Inseln mit jeweils identischen tertiäreren Nukleinsäuremoleküle bezeichnet.

**Fig. 2** veranschaulicht die Sequenzierung Oberflächen-gebundener Amplifikationsprodukte, wobei

- 1 das Lösen der Amplifikationsprodukte durch Restriktionsdau der Amplifikationsprodukte (Unterstrichen: die Erkennungsstelle für die Restriktionsendonuklease *SphI*) (SEQ ID NO: 4);
- 5 2 die Dephosphorylierung;
- 3 die Ligation eines Hairpin-Oligonukleotids (fett)
- 4 die Entfernung des nicht irreversibel immobilisierten Nukleinsäurestrangs (SEQ ID NO: 6);
- 10 5 den Einbau und Identifikation eines ersten geschützten Nukleotids;
- 6 die Entfernung von Schutzgruppe und Markierungsgruppe unter Wiederherstellung einer freien 3'-OH-Gruppe;
- 7 den Einbau und Identifikation eines zweiten geschützten Nukleotids;
- 15 8 die Wiederholung der Schritte 5 und 6 zeigt.

**Fig. 3** zeigt die Bereitstellung eines GTN durch Ausbildung einer Hairpinstruktur in Sequenzabschnitten die Linker entstammen. Die zu sequenziende Nukleinsäure (Restriktionsfragment mit zwei unterschiedlichen Enden, eines hiervon durch die Restriktionsendonuklease *NlaIII* erzeugt) ist schraffiert dargestellt. CATG, durch Restriktionsendonuklease *NlaIII* generierter Überhang; GCATGC, Erkennungsstelle für Restriktionsendonuklease *SphI* (enthält die Erkennungsstelle für *NlaIII*, CATG); NNNNNNNNNNN und MMMMMMMMM, „inverted repeats“ (zueinander komplementäre Sequenzen, die intramolekulare Rückfaltung eines Einzelstrangs erlauben); XXXXX und YYYYY, Spacer-region zur Oberfläche. Im einzelnen beschreibt

- 25 1 die Ligation eines Linkers mit „inverted repeat“ und *SphI*-Schnittstelle an zu sequenziertes Fragment;
- 2 die Denaturierung und Hybridisierung mit an einer Oberfläche immobilisiertem Primer;
- 3 die Amplifikation mit zwei an Oberfläche immobilisierten Primern (Gegenprimer nicht gezeigt);
- 30 4 das „halbseitige Lösen“ der Amplifikationsprodukte von der Oberfläche durch Restriktionsendonuklease *SphI* (Pfeile);
- 5 die Denaturierung und Entfernung des nicht an der Oberfläche immobilisierten Strangs ;
- 35 6 die Renaturierung unter Ausbildung eines Hairpins, Beginn der Sequenzierung durch Inkorporation entschützbarer Abbruchnukleotide.

**Fig. 3** zeigt eine bevorzugte Vorgehensweise zur Bereitstellung von als Sequenzierprimer dienenden Gegensträngen der tertiären Nukleinsäuren, GTN, indem die durch Behandlung

mit einer ersten Restriktionsendonuklease (in Fig. 3 etwa die Erkennungssequenz CATG aufweisend) mit überhängenden Enden ausgestatteten Nukleinsäuremoleküle zunächst über eine Ligation mit flankierenden Sequenzabschnitten in Form doppelsträngiger Linkermoleküle versehen werden, welche erstens selbstkomplementäre Bereiche umfassen und

5 zweitens distal an diese angrenzend eine Erkennungssequenz bzw. Schnittstelle für eine zweite Restriktionsendonuklease aufweisen. Bevorzugterweise handelt es sich hierbei wie in Fig. 3 gezeigt um eine Schnittstelle, deren innere Basen auf dem selben Strang identisch mit den Basen des besagten Überhangs sind (in Fig. 3 die Basenfolge CATG), mindestens eine der äußeren Basen jedoch sich von der entsprechenden, besagte Überhangsequenz vor

10 oder nach Ligation flankierenden Base unterscheidet. Beispielsweise ist in Fig. 3 gezeigt, daß der zur Ligation verwandte Überhang „CATG“ nach der Ligation an seinem 3'-Ende von der Base „T“ flankiert wird. Wird nun nach erfolgter Amplifikation der Nukleinsäuremoleküle in Schritt (a5) mittels eines Primerpaars, von dem ein Primer mit einem Strang besagter Linkermoleküle hybridisieren kann, mit einer zweiten Restriktionsendonuklease

15 geschnitten, welche beispielsweise die Erkennungssequenz „GCAGTC“ besitzt, und wurde diese Erkennungssequenz in besagten flankierenden Sequenzabschnitten (also als Teilsequenz der angefügten Linker) bereitgestellt, so erfolgt ein Schnitt innerhalb der bereitgestellten Sequenzabschnitte. Nach erfolgter Entfernung des dann nicht mehr irreversibel an die Oberfläche gebundenen Strangs kann der 3'-Terminus des immobilisiert bleibenden

20 Strangs intramolekular zu einem Hairpin rückfalten. Dabei ist bevorzugt, daß, wie in Fig. 3 gezeigt, die Erkennungssequenz besagter ersten und zweiten Restriktionsendonuklease unmittelbar an die eingeführten selbstkomplementären Bereiche grenzen, so daß diese Bereiche durch besagte Ligation um die beiden besagten Erkennungsstellen gemeinsamen Basen verlängert werden. Hierbei weisen die verlängerten selbstkomplementären Bereiche

25 dort eine Fehlpaarung auf, wo sich nach der Ligation die die Überhang-Sequenz flankierende Base (bzw. Basen) von der Erkennungssequenz der zweiten Restriktionsendonuklease unterscheidet bzw. unterscheiden (in Fig. 3 eine G/T-Fehlpaarung). Gleichzeitig gewährleistet die hier beschriebene Vorgehensweise, in der die Erkennungsstelle der ersten Restriktionsendonuklease Bestandteil der längeren Erkennungsstelle der zweiten Restriktionsendonuklease ist, daß die tertiären Nukleinsäuremoleküle bei der Inkubation mit der zweiten Restriktionsendonuklease keine internen Erkennungsstellen für die zweite Restriktionsendonuklease haben können, sondern lediglich exakt einmal im Bereich der flankierenden Sequenzen geschnitten werden.

30

35 Fig. 4 beschreibt die parallele Sequenzierung an einer Oberfläche. „Inseln“ identischer Nukleinsäuremoleküle sind in dieser Figur vereinfacht durch einen einzigen Strang symbolisiert. Im einzelnen zeigt

- 1 die Befestigung eines Sequenzierprimers, Einbau des ersten Abbruchnukleotids und parallele Detektion und Identifikation des jeweils ersten Nukleotidbausteins,
  - 2 die Entfernung von Schutzgruppe und Markierungsgruppe des ersten Nukleotids, Einbau des zweiten Abbruchnukleotids und parallele Detektion und Identifikation des jeweils zweiten Nukleotidbausteins;
  - 3 das Detektions- und Identifikationsergebnis der ersten Base;
  - 4 das Detektions- und Identifikationsergebnis der zweiten Base.
- 10 Fig. 5 beschreibt die Assemblierung der Detektions- und Identifikationsergebnisse zu zusammenhängenden Sequenzen, wobei
  - 1 die Detektions- und Identifikationsergebnisse der ersten Base,
  - 2 die Detektions- und Identifikationsergebnisse der zweiten Base,
  - 3 die Detektions- und Identifikationsergebnisse der n-ten Base,
  - 4 die assemblierten Sequenzen der Nukleinsäuremoleküle in einzelnen Inseln bezeichnet.
- 15 Fig. 6 zeigt die Bereitstellung primärer Nukleinsäuren zur Anwendung in der Expressionsanalyse, wobei im einzelnen

- 1 die cDNA-Synthese mit biotinyliertem Primer, Bindung der doppelsträngigen cDNA an Streptavidin-beschichtete Oberfläche;
- 2 den Restriktionsschnitt mit dem ersten Enzym (RE1), Fortwaschen der freigesetzten Fragmente, und den zweiter Restriktionsschnitt mit dem zweiten Enzym (RE2);
- 3 die Ligation zweier verschiedener Linker;
- 4 mRNA;
- 5 doppelsträngige an Festphase immobilisierte cDNA;
- 6 ein cDNA-Fragment, das von zwei verschiedenen „überhängenden“ Enden flankiert wird,
- 7 ein von zwei verschiedenen Linkern (L1, L2) flankiertes cDNA-Fragment zeigt.

- 20 Fig. 7 zeigt die Bereitstellung primärer Nukleinsäuren zur Sequenzierung genomischer Klone, wobei im einzelnen
- 1 einen Restriktionsschnitt eines genomischen Klons parallel mit jeweils zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen (RE1-2 bzw. RE3-4), Ligation verschiedener Linker (L1-4);
  - 2 einen genomischen Klon;

3 zwei überlappende Sätze mit Linkern ligierter Fragmente bezeichnet.  
Symmetrisch von identischen Linkern flankierte Fragmente (durchgestrichen) lassen sich nicht sequenzieren.

- 5 Fig. 8 zeigt das Ergebnis der Amplifikation einzelner Nukleinsäuremoleküle mittels Oberflächen-gebundener Primer zu Inseln aus jeweils identischen amplifizierten Nukleinsäuremolekülen, visualisiert durch Anfärbung mit SYBR Green I.

Die Erfindung wird im folgenden durch die Beispiele näher erläutert.

10

**Beispiel 1:**

Vorbereitung von Nukleinsäuremolekülen

- 4 µg Gesamt-RNA aus Rattenleber wurde mit Ethanol gefällt und in 15,5 µl Wasser gelöst. Es wurden 0,5 µl 10 µM cDNA-Primer CP28V (5'-  
15 ACCTACGTGCAGATTTTTTTTTTTT-3', SEQ ID NO: 1) hinzugegeben, 5 Minuten bei 65°C denaturiert und auf Eis gestellt. Die Mischung wurde mit 3 µl 100 mM Dithiothreitol (Life Technologies GmbH, Karlsruhe), 6 µl 5× Superscript-Puffer (Life Technologies GmbH, Karlsruhe), 1,5 µl 10 mM dNTPs, 0,6 µl RNase Inhibitor (40 U/µl; Roche Molecular Biochemicals) und 1 µl Superscript II (200 U/µl, Life Technologies) ver-  
20 setzt und zur cDNA-Erststrangsynthese 1 Stunde bei 42°C inkubiert. Zur Zweitstrangsynthese wurden 48 µl Zweitstrang-Puffer (vgl. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1999), John Wiley & Sons ), 3,6 µl 10 mM dNTPs, 148,8 µl H<sub>2</sub>O, 1,2 µl RNaseH (1,5 U/µl, Promega) und 6 µl DNA Polymerase I (New England Biolabs GmbH Schwabach, 10 U/µl) hinzugefügt und die Reaktionen 2 Stunden bei 22°C inkubiert. Es wurde  
25 mit 100 µl Phenol, dann mit 100 µl Chloroform extrahiert und mit 0,1 Vol. Natriumacetat pH 5,2 und 2,5 Vol. Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation für 20 Minuten bei 15.000 g und Waschen mit 70% Ethanol wurde das Pellet in einem Restriktionsansatz aus 15 µl 10× Universal buffer, 1 µl *Mbo*I und 84 µl H<sub>2</sub>O gelöst und die Reaktion 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Es wurde mit Phenol, dann mit Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt. Das  
30 Pellet wurde in einem Ligationsansatz aus 0,6 µl 10× Ligationspuffer (Roche Molecular Biochemicals), 1 µl 10 mM ATP (Roche Molecular Biochemicals), 1 µl Linker ML2025 (hergestellt durch Hybridisierung von Oligonukleotiden ML20 (5'-TCACATGCTAAGTCTCGCGA-3', SEQ ID NO: 5) und LM25 (5'-GATCTCGCGAGACTTAGCATGTGAC-3', SEQ ID NO: 7), ARK), 6,9 µl H<sub>2</sub>O und 0,5  
35 µl T4 DNA Ligase (Roche Molecular Biochemicals) gelöst und die Ligation über Nacht bei 16°C durchgeführt. Die Ligationsreaktion wurde mit Wasser auf 50 µl aufgefüllt, mit Phenol, dann mit Chloroform extrahiert und nach Zugabe von 1 µl Glycogen (20 mg/ml, Roche Molecular Biochemicals) mit 50 µl 28% Polyethylenglycol 8000 (Promega)/10 mM

MgCl<sub>2</sub> gefällt. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und in 100 µl Wasser aufgenommen.

**Beispiel 2:**

5    **Beschichtung mit Oligonukleotiden**

Lyophilisierte, an ihrem 5'-Ende Aminolink-Gruppen tragende Oligonukleotide Amino-M13rev (5'-Amino-CAGGAAACAGCGATGAC-3', SEQ ID NO: 8) und Amino-T7 (5'-Amino-TAATACGACTCACTATAGG-3', SEQ ID NO: 10) (ARK Scientific GmbH, Darmstadt) wurden zu einer Endkonzentration von 1 mM in 100 mM Natriumcarbonatpuffer pH 9 aufgenommen. Mikroskopie-Objektträger aus Glas („Slides“; neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg) wurden 1 Stunde in Chromschwefelsäure gereinigt und danach 4x mit destilliertem Wasser gewaschen. Nach Lufttrocknung wurden die Slides 5 Minuten in einer 1%igen Lösung von 3-Aminopropyltrimethoxysilan („Fluka“: Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze) in 95% Aceton/5% Wasser behandelt. Danach wurde zehnmal für je 5 Minuten in Aceton gewaschen und 1 Stunde auf 110°C erhitzt. Dann wurden die Slides für 2 Stunden in 0,2% 1,4-Phenylen-diisothiocyanat („Fluka“: Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze) in einer Lösung aus 10% Pyridin in trockenem Dimethylformamid (Merck KGaA, Darmstadt) eingelegt. Nach 5 Waschschritten in Methanol und 3 Waschschritten in Aceton wurden die Slides luftgetrocknet und direkt zur Beschichtung weiterverarbeitet. Selbstklebende „Frame Seal“-Rähmchen für 65 µl-Reaktionskammern (MJ Research Inc., Watertown, Minnesota, USA) wurden aufgebracht, 65 µl Oligonukleotid-Lösung wurden in die so gebildeten Reaktionskammern pipettiert, und die Kammern wurden durch Aufkleben eines Polyester-Deckblatts (MJ Research Inc.) unter Ausschluß von Luftblasen versiegelt. Die genaue Position der Reaktionskammer wurde mit einem wasserfesten Filzschreiber auf der Unterseite der Slides gekennzeichnet. Die Bindung der Oligonukleotide via Aminolink an die Oberfläche der aktivierten Slides fand über 4 Stunden bei 37°C statt. Anschließend wurden die Kleberahmen entfernt und die Slides mit deionisiertem Wasser abgespült. Um verbliebene reaktive Gruppen zu inaktivieren, wurden die Slides für 15 Minuten in auf 50°C temperierter Blockierungslösung (50 mM Ethanolamin („Fluka“: Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze), 0,1 M Tris pH 9 („Fluka“: Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze), 0,1% SDS („Fluka“: Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze)) behandelt. Zur Entfernung nicht-kovalent gebundener Oligonukleotide wurden die Slides 5 Minuten in 800 ml 0,1x SSC/0,1% SDS (vgl. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1999), John Wiley & Sons) gekocht. Die Slides wurden mit deionisiertem Wasser gewaschen und luftgetrocknet.

**Beispiel 3:**

**Beschichtung mit Oligonukleotiden**

Lyophilisierte, an ihrem 5'-Ende Aminolink-Gruppen tragende Oligonukleotide Amino-M13rev (5'-Amino-CAGGAAACAGCGATGAC-3', Abfolge der Nukleotide gemäß SEQ ID NO: 8) und Amino-T7 (5'-Amino-TAATACGACTCACTATAGG-3', Abfolge der Nukleotide gemäß SEQ ID NO: 10) (ARK Scientific GmbH, Darmstadt) wurden zu einer 5 Endkonzentration von 100 pmol/µl in deionisiertem Wasser aufgenommen. Je 1,4 µl dieser Primerlösungen wurden mit 32,2 µl Wasser und 35 µl 2× Bindepuffer (300 mM Natriumphosphat pH 8,5) vermischt. Selbstklebende „Frame Seal“-Rähmchen für 65µl-Reaktionskammern (MJ Research Inc., Watertown, Minnesota, USA) wurden auf „3D-Link activated slides“ (zur Bindung Amino-modifizierter Nukleinsäuren aktivierte Objektträger aus Glas; (Surmodics, Eden, Prairie, Minnesota, USA) aufgebracht. 65 µl Oligonukleotid-Lösung wurden in die so gebildeten Reaktionskammern pipettiert, und die Kammern wurden durch Aufkleben eines Polyester-Deckblatts (MJ Research Inc., Watertown, Minnesota, USA) unter Ausschluß von Luftblasen versiegelt. Die genaue Position der Reaktionskammer wurde mit einem wasserfesten Filzschreiber auf der Unterseite der Slides 10 gekennzeichnet. Die Bindung der Oligonukleotide via Aminolink an die Oberfläche der aktivierten Slides fand über Nacht bei Raumtemperatur statt. Anschließend wurden die Kleberahmen entfernt und die Slides mit deionisiertem Wasser abgespült. Um verbliebene reaktive Gruppen zu inaktivieren, wurden die Slides für 15 Minuten in auf 50°C temperierter Blockierungslösung (50 mM Ethanolamin („Fluka“: Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze), 0,1 M Tris pH 9 („Fluka“: Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze), 0,1% SDS 15 („Fluka“: Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze) behandelt. Zur Entfernung nicht-kovalent gebundener Oligonukleotide wurden die Slides 5 Minuten in 800 ml 0,1× SSC/0,1% SDS (vgl. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1999), John Wiley & Sons) gekocht. Die Slides wurden mit deionisiertem Wasser gewaschen und luftgetrocknet.

25

**Beispiel 4:**

Plasmide pRNODCAB (enthält Basen 982 bis 1491 des Transkripts von Ornithindecarboxylase aus Ratte, AC-Nummer J04791, kloniert in Vektor pCR II (Invitrogen BV, Groningen, Niederlande) und pRNHPRT (enthält Basen 238 bis 720 des Transkripts Hypoxanthinphosphoribosyltransferase aus Ratte, AC-Nummer M63983, kloniert in Vektor pCR II (Invitrogen)) wurden linearisiert, indem je 1 µg Plasmid in einem Volumen von 20 µl 1× Restriktionspuffer H („Roche Molecular Biochemicals“: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) mit je 5 U der Restriktionsenzyme *Bgl*/II und *Sca*I (Roche Molecular Biochemicals) für 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert wurde. Anschließend wurde eine Amplifikation 30 der Vektor-Inserts vorgenommen, indem je 1 µl der Restriktionsansätze in einem Volumen von 100 µl PCR-Puffer II (Perkin-Elmer, Foster City, California, USA) mit 4 µl 10 mM Primer T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGG-3', SEQ ID NO: 10), 4 µl 10 mM Primer M13 (5'-CAGGAAACAGCGATGAC-3', SEQ ID NO: 8) (ARK), 4 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>

- („Fluka“: Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze), 5 µl Dimethylsulfoxid („Fluka“: Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze), 1 µl 10 mM dNTPs (Roche Molecular Biochemicals), und 1 µl AmpliTaq DNA Polymerase (5U/µl; Perkin-Elmer) versetzt wurde. Anschließend wurden die Reaktionen in einem Gene Amp 9700 Thermocycler (Perkin-Elmer) einem Temperaturprogramm bestehend aus 20 Zyklen Denaturierung für 20 Sekunden bei 95°C, Primerannealing für 20 Sekunden bei 55°C und Primerextension für 2 Minuten bei 72°C unterworfen. Die Amplifikationsprodukte wurden elektrophoretisch auf einem 1,5% Agarosegel auf ihre richtige Größe hin untersucht. Zur Entfernung uninkorporierter Primer wurden die Reaktionen mittels QiaQuick-Säulen (Qiagen AG, Hilden) gemäß den Angaben des Herstellers gereinigt und in 50 µl deionisierten Wassers eluiert.

**Beispiel 5:**  
**Amplifikation**  
Zur Befestigung von in Beispiel 2 vorbereiteten Nukleinsäuren an Glasträgern wurden Annealing-Mischungen aus je 1 µl unverdünnter oder in parallelen Ansätzen 1:10, 1:100 bzw. 1:1000 mit Wasser verdünnter Amplifikationsprodukt-Lösungen, je 4 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung, je 1 µl Rinderserumalbumin (20 mg/ml; Roche Molecular Biochemicals), je 5 µl Dimethylsulfoxid, je 1 µl 10 mM dNTPs und je 1 µl AmpliTaq in einem Gesamtvolumen von je 100 µl 1× PCR-Puffer II hergestellt. Unter Beachtung der Filzschreiber-Markierungen auf der Slide-Unterseite wurden Frame-Seal-Kammern in den zur Oligonukleotid-Beschichtung verwendeten Positionen auf die in Beispiel 1 vorbereiteten Slides aufgebracht. Dann wurden je 65 µl der Annealing-Mischungen in die Reaktionskammern pipettiert und die Kammern wie oben versiegelt. Die Slides wurden auf den Heizblock eines UNO II-in situ-Thermocyclers (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen) gelegt, mit einem Polster aus Papiertüchern abgedeckt und mittels des höhenverstellbaren Heizdeckels an den Heizblock gepreßt. Zum Annealing und der nachfolgenden Primerextension kam folgendes Temperaturprogramm zur Anwendung: Denaturierung 30 Sekunden bei 94°C, Annealing 10 Minuten bei 55°C, Primerextension 1 Minute bei 72°C. Nach erfolgter Reaktion wurden die Reaktionskammern entfernt und die Slides wurden mit deionisiertem Wasser abgespült. Zur Entfernung der nicht-kovalent gebundenen Stränge wurde 1 Minute in 800 ml 0,1× SSC/0,1% SDS gekocht, die Slides mit Wasser abgespült und luftgetrocknet. Um eine kompartimentierte Amplifikation der an den Träger gebundenen Nukleinsäuremoleküle vorzunehmen, wurden erneut an den zuvor gewählten Positionen Reaktionskammern aufgebracht und 65 µl einer Amplifikationsmischung aufgetragen, zusammengesetzt wie folgt: 4 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µl Rinderserumalbumin (20 mg/ml), 5 µl Dimethylsulfoxid, 1 µl AmpliTaq (5 U/µl), 1 µl 10 mM dNTPs, in 100 µl 1× PCR-Puffer II. Nach Versiegelung der Kammern wurde auf dem in situ-Thermocycler folgendes Temperaturprogramm angewendet: Denaturierung 20 Sekunden bei 93°C, Primerannealing

20 Sekunden bei 55°C, Extension 1 Minute bei 72°C, für 50 Zyklen. Nach beendeter Amplifikation wurden die Kammern entfernt und die Slides mit Wasser abgespült und luftgetrocknet. Zur Detektion der durch kompartimentierte Amplifikation entstandenen klonalen Inseln wurden 40 µl SYBR Green I-Lösung (Molecular Probes; Lösung 1:10.000 in Wasser) auf die Slides pipettiert und mit Deckgläsern #2 (MJ) abgedeckt. Die Detektion erfolgte auf einem konfokalen Mikroskop TCS-NT (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Heidelberg) bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Detektionswellenlänge von 530 nm. Es konnten klonale Inseln kompartimentiert amplifizierter Nukleinsäuremoleküle detektiert werden, die sich in einer Zufallsanordnung über die Slideoberfläche im Bereich der Reaktionskammern verteilten (vergl. Fig. 8). Im Bereich von Reaktionskammern, in denen als Negativkontrolle entweder keine Oligonukleotide an den Träger gebunden worden waren oder in denen die Amplifikationsreaktion ohne vorherige Hybridisierung von Template-Molekülen vorgenommen worden war, wurden hingegen keine von klonalen Inseln stammende Signale detektiert. Weiterhin zeigte der Vergleich der Slide-Oberflächen im Bereich von Reaktionskammern, in denen unterschiedliche Konzentrationen von Template eingesetzt worden war, eine klare Abhängigkeit der Anzahl gebildeter klonaler Inseln von der Menge an eingesetzten Molekülen.

**Beispiel 6:**

20 Zur Identifikation der Nukleinsäuremoleküle in den detektierten klonalen Inseln wurden die Slides nach der Detektion der mittels SYBR Green angefärbten doppelsträngigen DNA 10 Minuten in Wasser entfärbt. Dann wurden erneut Reaktionskammern an den gleichen Positionen wie zuvor aufgeklebt und eine Restriktionsmischung, bestehend aus 12 µl 10× Universal buffer (Stratagene GmbH, Heidelberg), 1 µl Rinderserumalbumin, 3 µl Restriktionsendonuklease *Mbo*I (1 U/µl; Stratagene) und 64 µl Wasser, hinzupipettiert. Zur Restriktion der Nukleinsäuremoleküle mittels der internen *Mbo*I-Schnittstelle wurde 1,5 h bei 37°C inkubiert, dann wurden die Reaktionskammern entfernt und die Slides mit Wasser gewaschen. Die nicht kovalent an den Glaträger gebundenen Strangfragmente wurden durch Denaturierung für 2 Minuten in 800 ml kochendem 0,1× SSC/0,1% SDS entfernt.

25 Nach erneutem Waschen in Wasser und Lufttrocknung wurden neue Reaktionskammern aufgebracht. Pro Hybridisierungsexperiment wurde eine Hybridisierungslösung aus 8 µl 10× PCR-Puffer II, 3,2 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µl 100 pmol/µl Oligonukleotidsonde Cy5-HPRT (5'-Cy5-TCTACAGTCATAGGAATGGACCTATCACTA-3', SEQ ID NO: 3; ARK), 2 µl 100 pmol/µl Oligonukleotidsonde Cy3-ODC (5'-Cy3-ACATGTTGGTCCCCAGATGCTGGATGAGTA-3', SEQ ID NO: 2) und 65 µl Wasser hergestellt. Für jedes Hybridisierungsexperiment wurden 65 µl hiervon in die jeweilige Reaktionskammer gegeben und 3 Stunden bei 50°C hybridisiert. Nach Beendigung der Hybridisierung wurden die Reaktionskammern entfernt und die Slides 5 Minuten bei

Raumtemperatur in 30 ml 0,1× SSC/0,1% SDS gewaschen. Die Slides wurden kurz mit destilliertem Wasser abgespült, luftgetrocknet und zur Detektion eingesetzt. Die Detektion erfolgte wie oben mit Hilfe eines konfokalen Lasermikroskops. Als Anregungswellenlängen wurden 568 nm und 647 nm verwendet, nachgewiesen wurden Signale bei 600 nm und 5 bei 665 nm. Es konnte gezeigt werden, daß die zuvor mit SYBR Green detektierten klonalen Inseln zum Teil durch die Sonde Cy3-ODC und zum Teil durch die Sonde Cy5-HPRT detektiert wurden.

**Beispiel 7:**

- 10 Expressionsanalyse durch hochparallele Sequenzierung von Nukleinsäuremolekülen  
Die in Beispiel 1 erhaltenen Ligationsprodukte wurden 1:1000 mit Wasser verdünnt und 1 µl dieser Verdünnung wie in Beispiel 5 beschrieben für 50 Zyklen kompartimentiert amplifiziert. Hierfür wurden wie beschrieben mit den Amplifikationsprimern Amino-CP28V (5'-Amino-ACCTACGTGCAGATTTTTTTTTTV-3', Abfolge der Nukleotide gemäß SEQ ID NO: 1) und Amino-ML20 (5'-Amino-TCACATGCTAAGTCTCGCGA-3', Abfolge der Nukleotide gemäß SEQ ID NO: 5) beschichtete Glasslides verwendet. Zur einseitigen Ablösung der Amplifikationsprodukte vom Träger wurde die Amplifikationsmischung durch eine Restriktionsmischung ersetzt, bestehend aus 12 µl 10× Universal buffer (Stratagene), 1 µl Rinderserumalbumin, 4 µl Restriktionsendonuklease *Mbo*I, in einem 15 Endvolumen von 65 µl. Nach Inkubation bei 37°C für 2 h wurde die Restriktionsmischung ersetzt durch eine Dephosphorylierungsmischung aus 1 U alkalischer Phosphatase aus arktischen Krabben (Amersham) in 65 µl des mitgelieferten Reaktionspuffers. Nach Inkubation für 1 Stunde bei 37°C und Inaktivierung für 15 Minuten bei 65°C wurden Reaktionskammern und die Dephosphorylierungsmischung entfernt, die Slides gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen, erneut Reaktionskammern aufgebracht und mit 65 µl einer Ligationsmischung gefüllt, bestehend aus 3 U T4 DNA-Ligase (Roche Diagnostics) und 20 500 ng am 5'-Ende phosphoryliertem Hairpin-Sequenzierprimer SLP33 (5'-TCTTCGAATGCACTGAGCGCATTGAAAGAGATC-3', SEQ ID NO: 9) in 65 µl des mitgelieferten Ligationspuffers. Es wurde 14 Stunden bei 16°C ligiert, dann wurden Ligationsmischung und Reaktionskammern entfernt. Zur Entfernung der nicht kovalent an den Glasträger gebundenen Strangfragmente wurde für 2 Minuten in 800 ml kochendem 0,1× 25 SSC/0,1% SDS behandelt und mit destilliertem Wasser nachgewaschen. Zur Herstellung geeigneter entschützbarer Abbruchnukleotide wurden dATP, dCTP, dGTP und dTTP (Roche Molecular Biochemicals) an ihrer 3'-OH-Gruppe mit 4-Aminobuttersäure verestert.  
30 Diese Derivate wurden mit den Fluoreszenzgruppen FAM (dATP, dCTP) und ROX (dGTP, dTTP) markiert (Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, USA). Zur parallelen Bestimmung der ersten Base wurden erneut Reaktionskammern auf die Slides aufgebracht und eine Primerextensionsmischung aus 1 mM FAM-dATP, 1 mM ROX-dGTP und 2 U 35

Sequenase (United States Biochemical Corp., Cleveland, Ohio, USA) in 65 $\mu$ l Reaktionspuffer (40 mM Tris-HCl pH 7,5, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, und 25 mM NaCl) eingefüllt. Nach Inkubation bei 37°C für 5 Minuten wurde mit Reaktionspuffer gewaschen und auf dem Laserscanningmikroskop detektiert. Anregungswellenlängen waren 488 nm und 568 nm,

5 detektiert wurde bei 530 nm und bei 600 nm. Nach der Detektion wurde erneut Primerextensionsmischung zugegeben, welche nun die übrigen beiden markierten Nukleotide, FAM-dCTP und ROX-dTTP, enthielt. Nach erfolgter Inkorporation wurde erneut gewaschen und detektiert, und die Schutzgruppen wurden durch enzymatische Spaltung entfernt. Hierzu wurde mit 5 mg/ml Chirazyme L Lipase (Roche Diagnostics) in 100 mM

10 Kaliumphosphatpuffer pH 9 für 1 h bei 35°C behandelt. Anschließend wurde die Sequenzierung wie oben beschrieben für 15 weitere Zyklen durchgeführt.

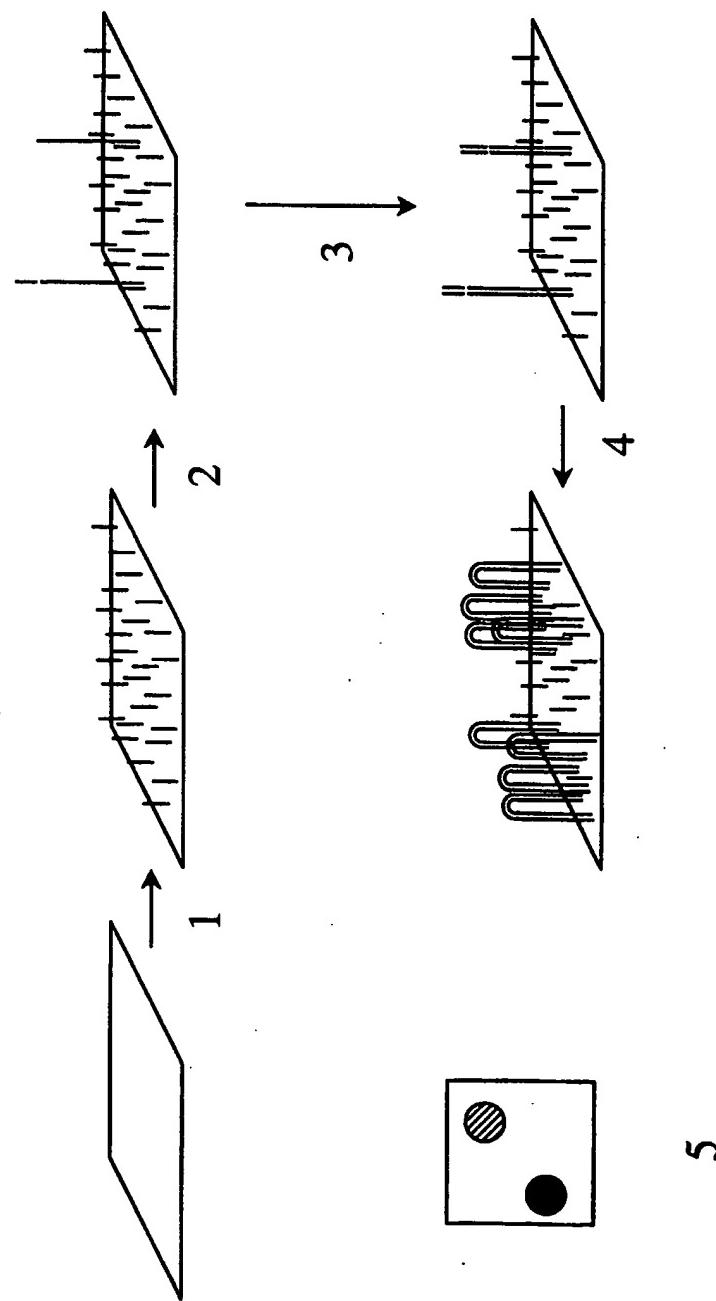
**Patentansprüche**

1. Verfahren zur parallelen Sequenzierung von mindestens zwei verschiedenen in einem Nukleinsäuregemisch enthaltenen Nukleinsäuren, wobei
  - (a) eine Oberfläche bereitgestellt wird, aufweisend Inseln von Nukleinsäuren jeweils gleicher Sorte, tertiäre Nukleinsäuren;
  - (b) Gegenstränge der tertiären Nukleinsäuren, GTN, bereitgestellt werden;
  - (c) die GTN um ein Nukleotid verlängert werden, wobei
    - das Nukleotid an der 2'-OH-Position oder an der 3'-OH-Position eine Schutzgruppe trägt, die eine weitere Verlängerung verhindert,
    - das Nukleotid eine Molekülgruppe trägt, die die Identifikation des Nukleotids ermöglicht;
  - (d) das eingebaute Nukleotid identifiziert wird;
  - (e) die Schutzgruppe entfernt wird und die zur Identifikation verwendete Molekülgruppe des eingebauten Nukleotids entfernt oder verändert wird, und
  - (f) Schritt (c) und nachfolgende Schritte solange wiederholt werden, bis die gewünschte Sequenzinformation erhalten worden ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei im Schritt (a)
  - (a1) eine Oberfläche bereitgestellt wird, an welche mindestens Primermoleküle eines ersten Primers und eines zweiten Primers und gegebenenfalls ein Nukleinsäuregemisch umfassend die Nukleinsäuremoleküle, mit welchen beide Primer hybridisieren können, irreversibel immobilisiert worden sind, wobei beide Primer ein Primerpaar bilden;
  - (a2) Nukleinsäuremoleküle des Nukleinsäuregemischs mit einem oder mit beiden Primern desselben Primerpaars hybridisiert werden;
  - (a3) die irreversibel immobilisierten Primermoleküle komplementär zum Gegenstrang unter Bildung von sekundären Nukleinsäuren verlängert werden;
  - (a4) die Oberfläche in einer von Nukleinsäuremolekülen, die nicht durch irreversible Immobilisierung an die Oberfläche gebundenen sind, befreiten Form bereitgestellt wird;
  - (a5) die sekundären Nukleinsäuren unter Bildung von tertiären Nukleinsäuren amplifiziert werden;
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei im Schritt (a1)

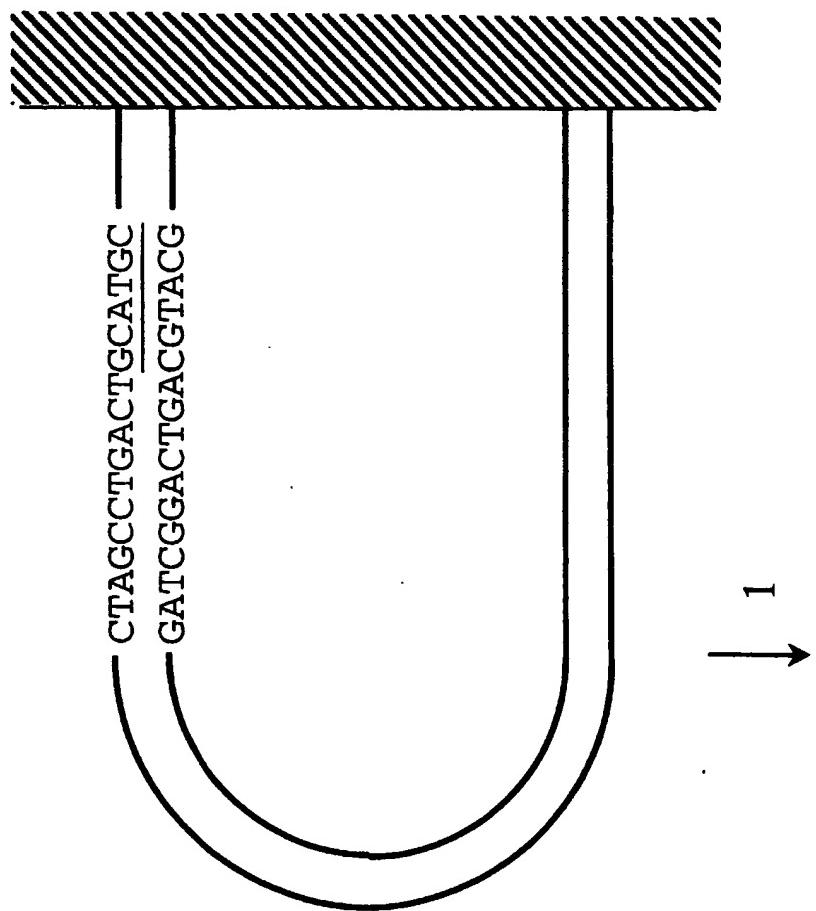
eine Oberfläche, an welche mindestens ein Primerpaar bildende Primermoleküle irreversibel immobilisiert wurden, bereitgestellt wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt  
(a1) Primer oder Nukleinsäuremoleküle mit flankierenden Sequenzabschnitten verwendet werden, die selbstkomplementäre Bereiche aufweisen.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt  
(b) die tertiären Nukleinsäuren durch eine Restriktionsendonuklease geschnitten werden bevor an die auf diese Weise generierten Enden Oligonukleotide, die zur Ausbildung einer Hairpinstruktur fähig sind, ligiert werden.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die zur Ausbildung einer Hairpinstruktur befähigten Oligonukleotide einzelsträngig sind.
7. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die zur Ausbildung einer Hairpinstruktur befähigten Oligonukleotide doppelsträngig sind.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt  
(b) einzelsträngige Oligonukleotide, die zur Ausbildung einer Hairpinstruktur fähig sind, an tertiäre Nukleinsäuren hybridisiert werden, bevor tertiäre Nukleinsäuren und vorgenannte einzelsträngige Oligonukleotide ligiert werden.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt  
(b) einzelsträngige Oligonukleotide, die zur Ausbildung einer Hairpinstruktur fähig sind, mit tertiären Nukleinsäuren durch Ligation verknüpft werden.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 9 dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt  
(a1) die Primermoleküle durch Ausbildung einer kovalenten Bindung an eine Oberfläche irreversibel immobilisiert werden.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt  
(c) die Base die Molekülgruppe trägt, die die Identifikation des Nukleotids ermöglicht.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt  
(c) die Schutzgruppe die Molekülgruppe trägt, die die Identifikation des Nukleotids ermöglicht.

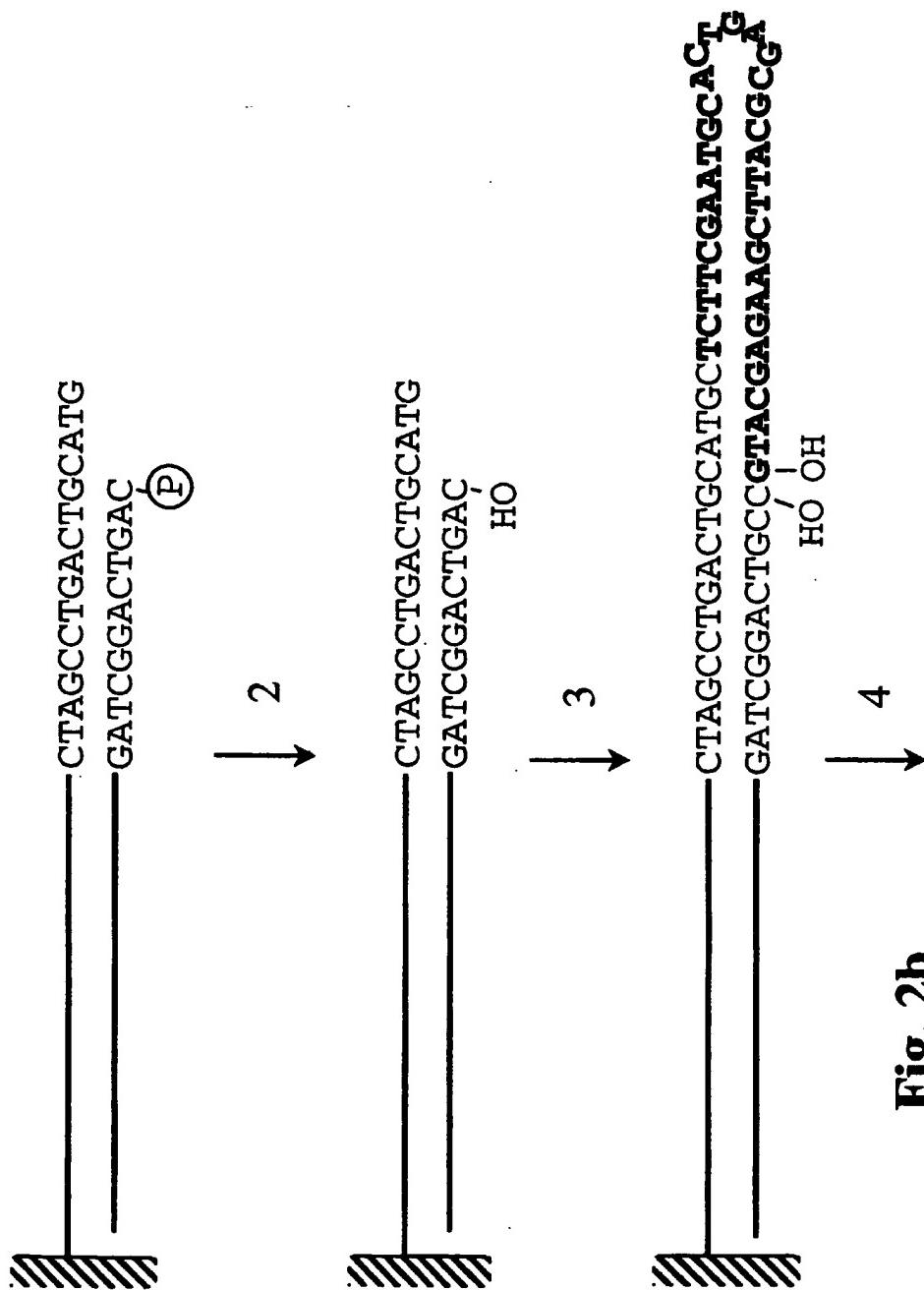
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt  
(c) das Nukleotid an der 3'-OH-Position die Schutzgruppe trägt.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt  
(c) das Nukleotid an der 2'-OH-Position die Schutzgruppe trägt.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt  
(c) die Schutzgruppe eine spaltbare Ester-, Ether-, Anhydrid- oder Peroxid-Gruppe  
aufweist.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt  
(c) die Schutzgruppe über eine Sauerstoff-Metall-Bindung mit dem Nukleotid verbun-  
den ist.
17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt (e) die Entfer-  
nung der Schutzgruppe durch ein komplexbildendes Ion, vorzugsweise durch Cyanid,  
Thiocyanat, Fluorid oder Ethyldiamintetraacetat erfolgt.
18. Verfahren einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt (e)  
die Schutzgruppe photochemisch abgespalten wird.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt  
(c) die Schutzgruppe einen Fluorophor aufweist und in Schritt (d) das Nukleotid fluo-  
rometrisch identifiziert wird.



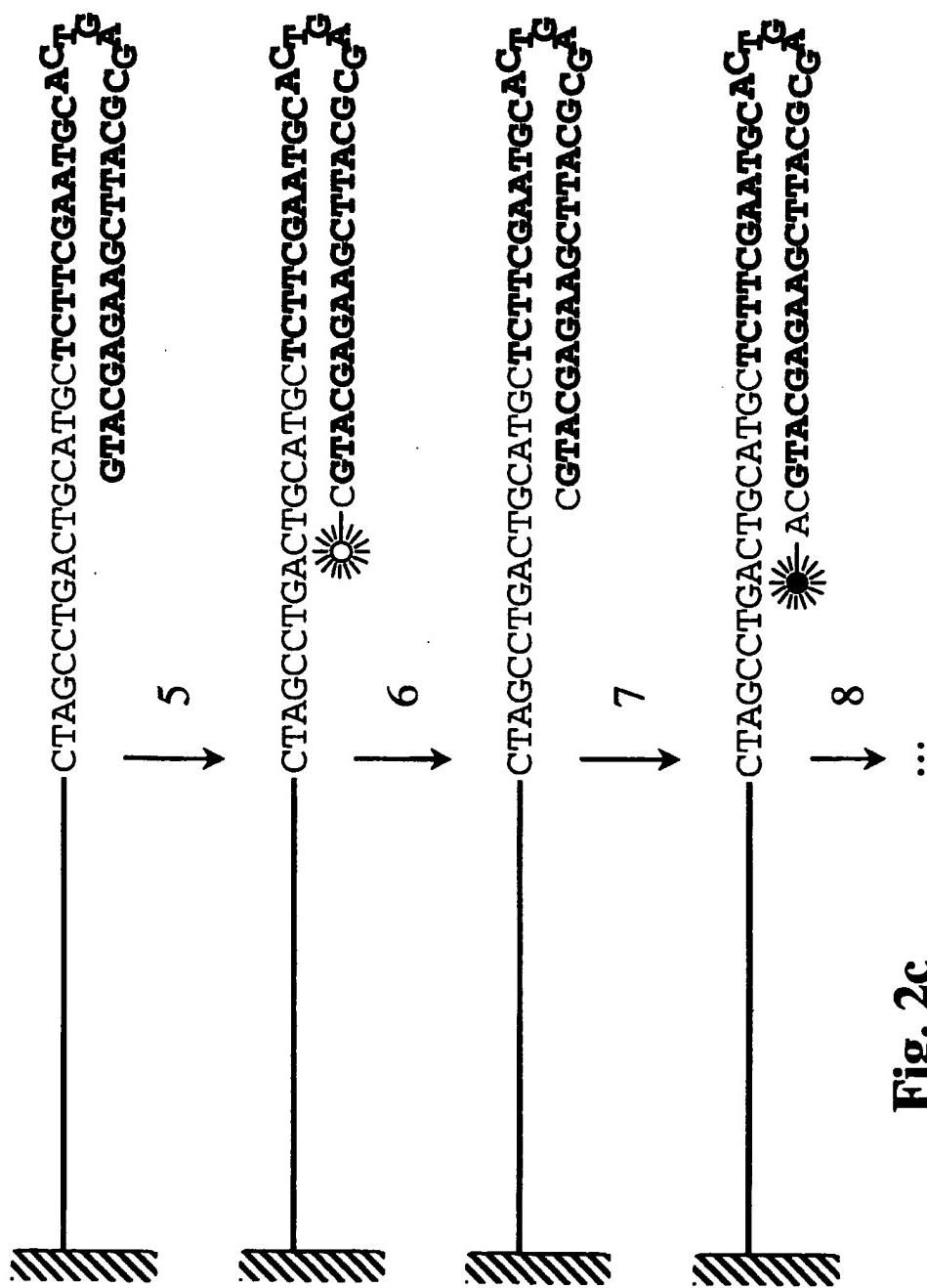
**Fig. 1**



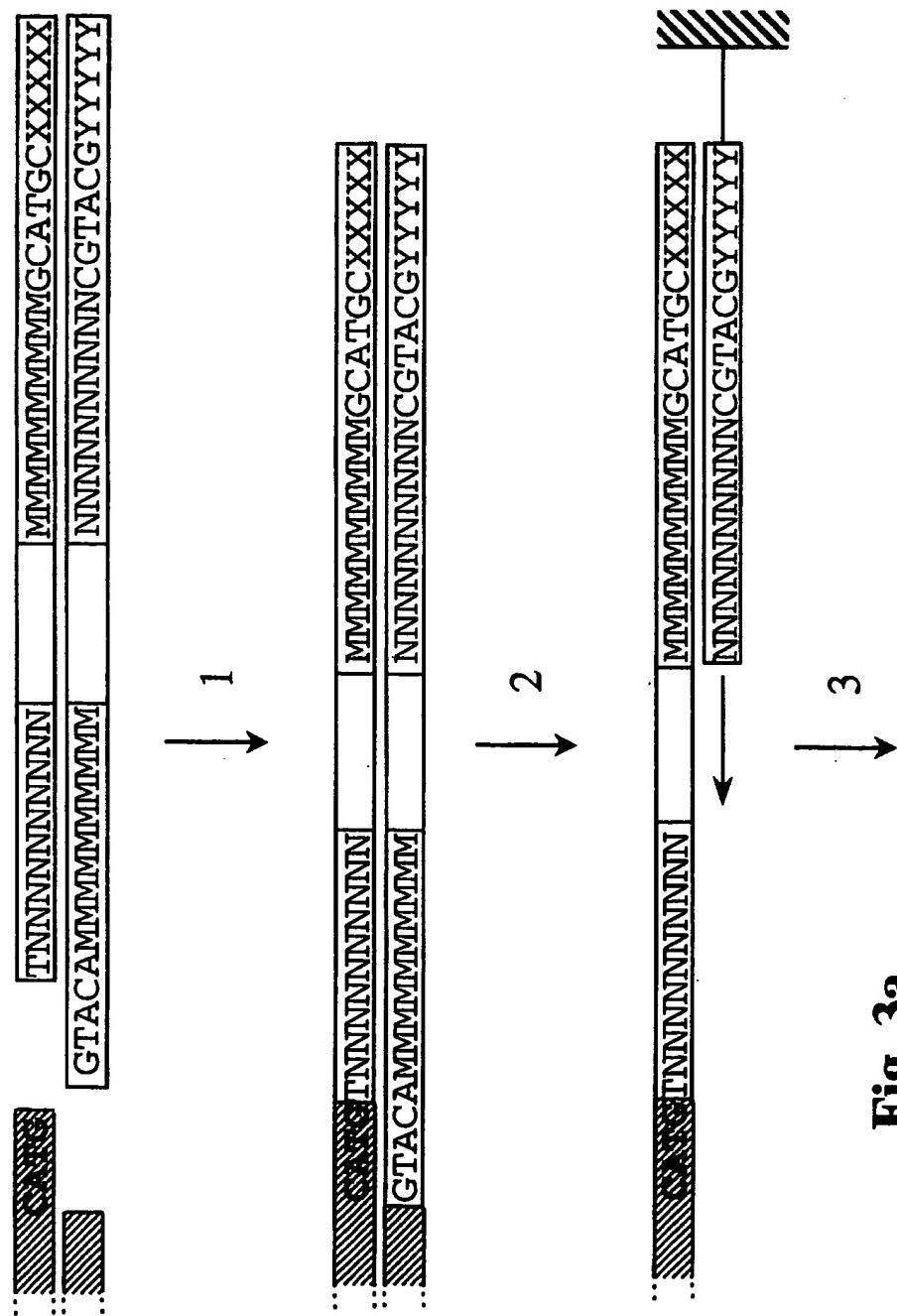
**Fig. 2a**



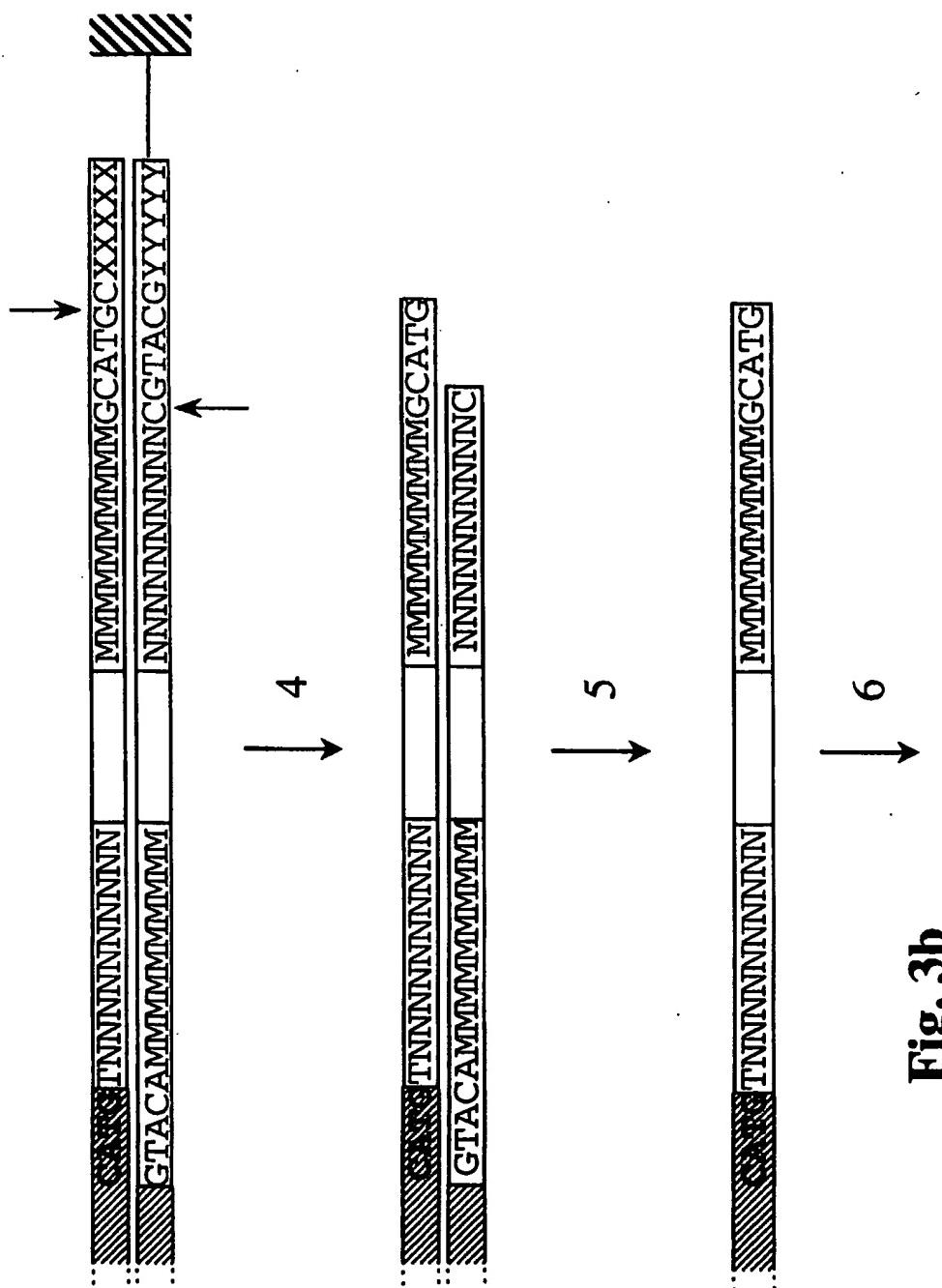
**Fig. 2b**



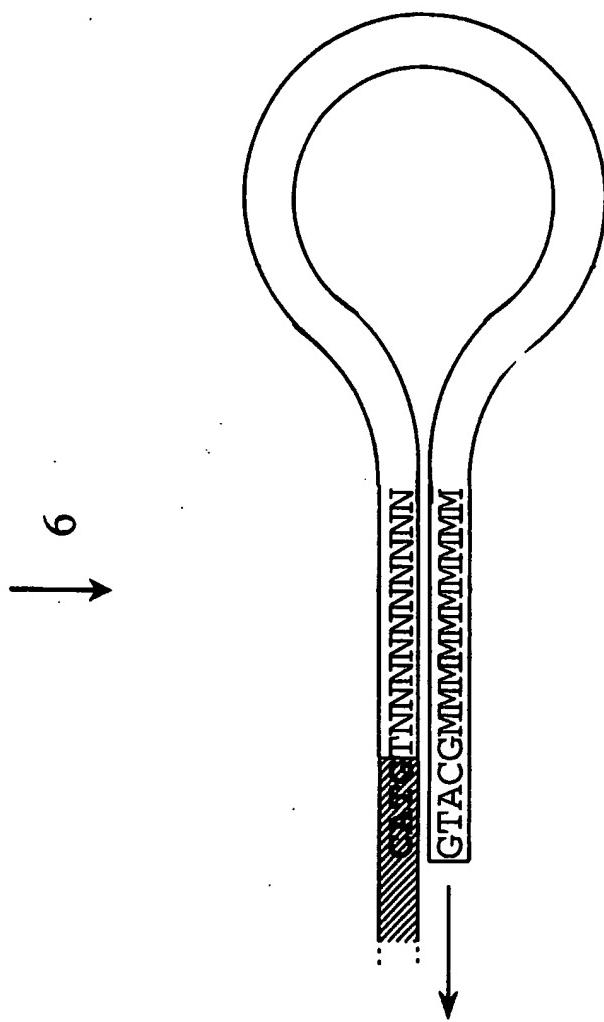
**Fig. 2c**



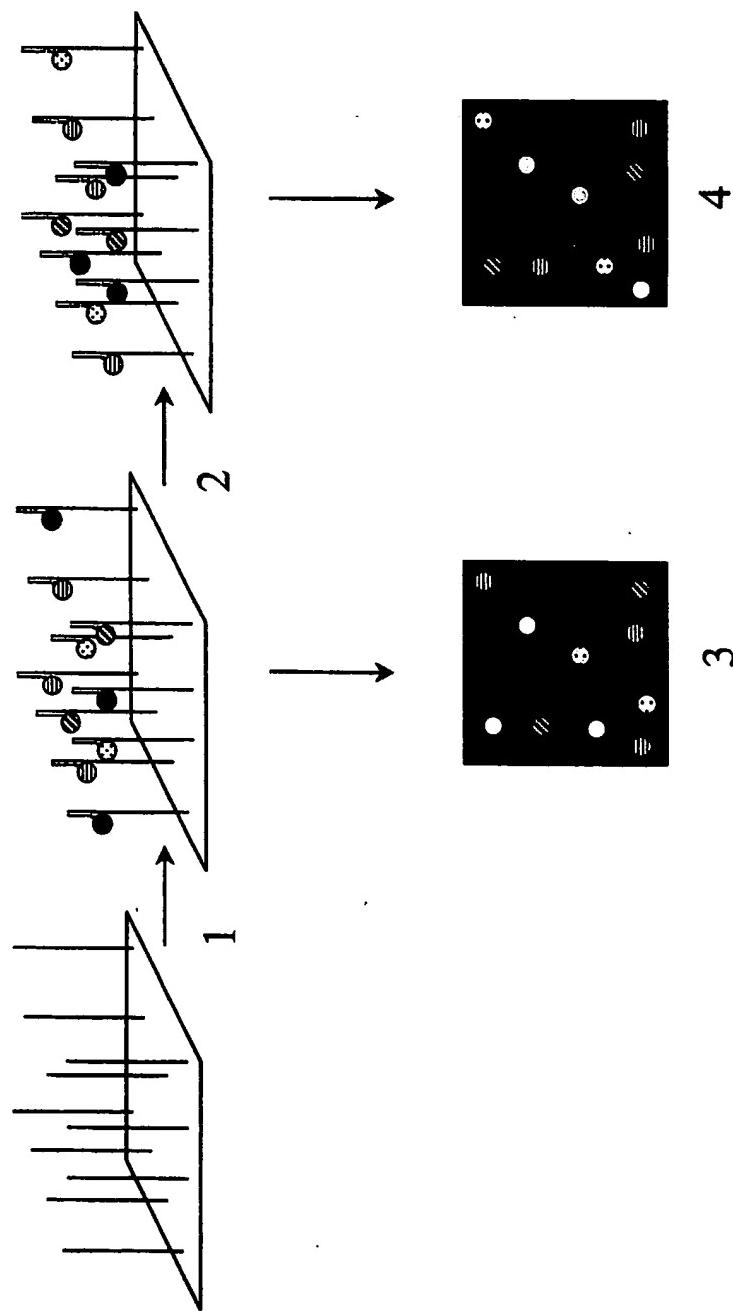
**Fig. 3a**



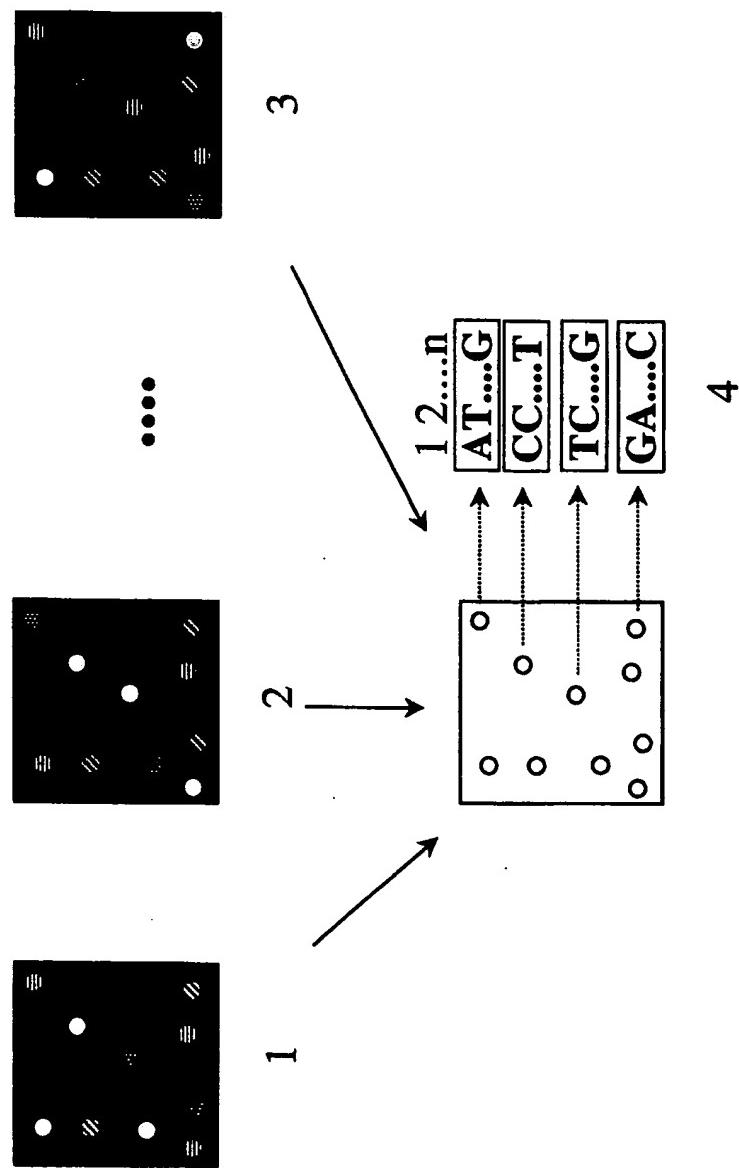
**Fig. 3b**



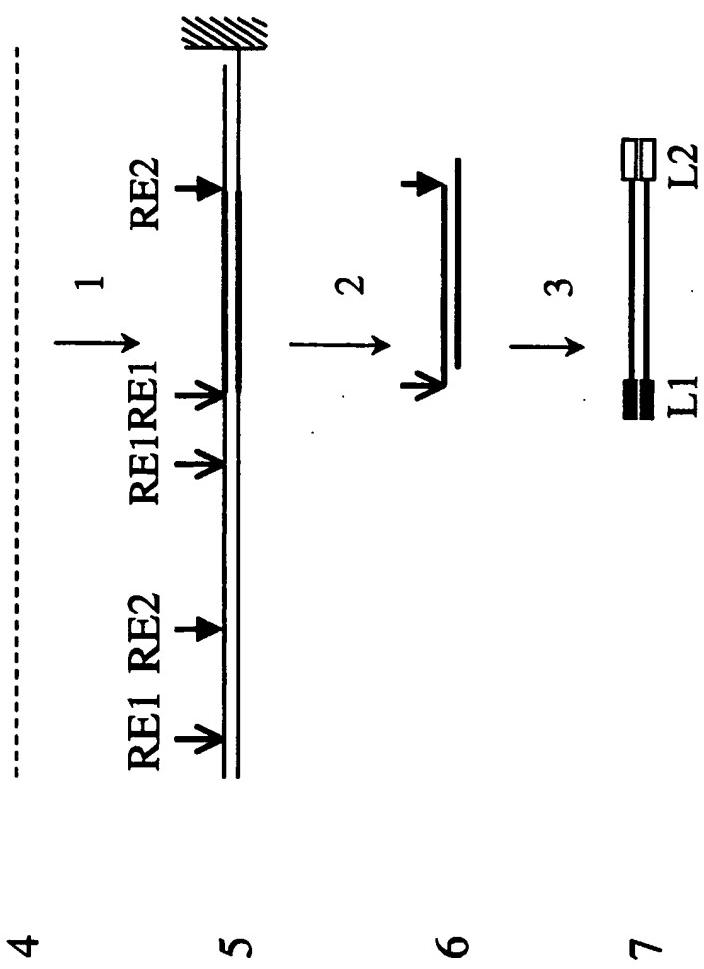
**Fig. 3c**



**Fig. 4**



**Fig. 5**



**Fig. 6**

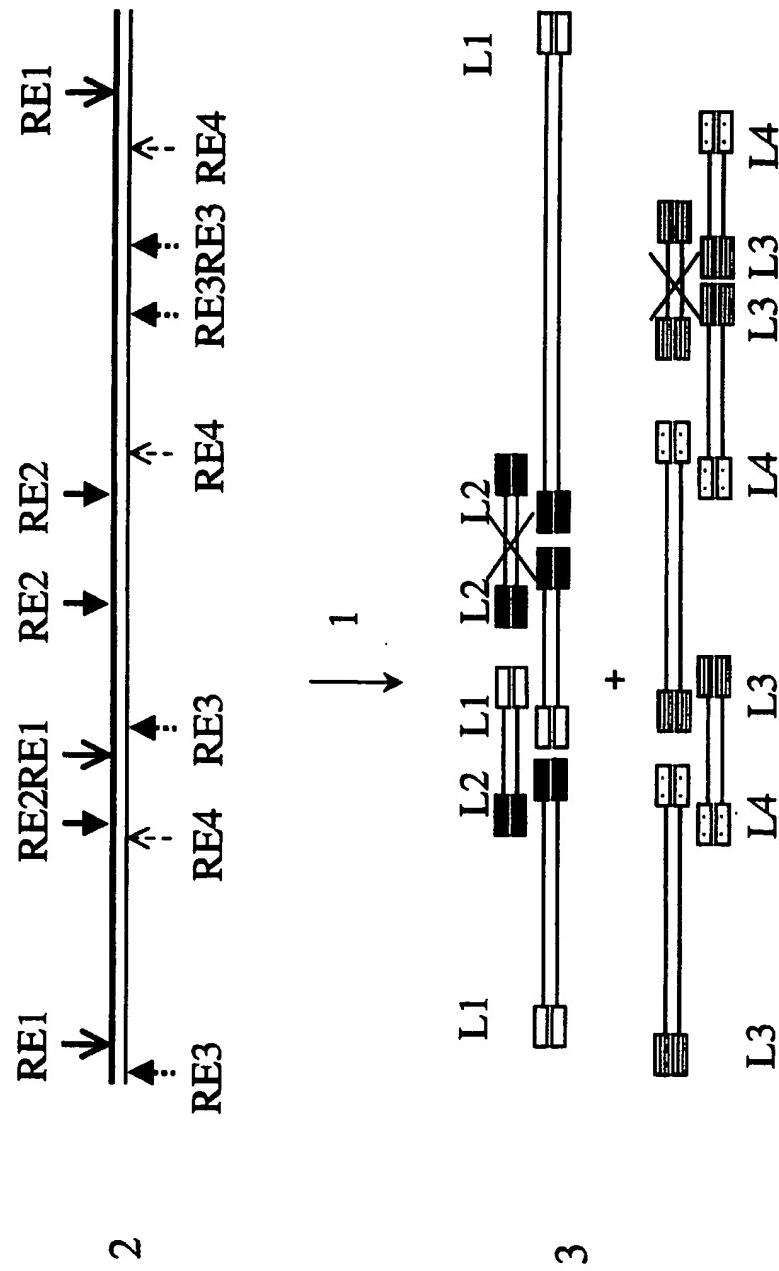
**Fig. 7**



Fig. 8

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF-LYNX Bioscience AG  
<120> Neue Verfahren zur parallelen Sequenzierung eines Nukleinsäuregemisches an einer Oberfläche  
<130> BL60923PC  
<140>  
<141>  
<150> 19962893.9  
<151> 1999-12-23  
<150> 10051564.9  
<151> 2000-10-18  
<160> 10  
<170> PatentIn Ver. 2.1  
<210> 1  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
synthetisches Oligonukleotid unter der Bezeichnung CP28V  
<400> 1  
acctacgtgc agatttttt ttttttttt tv  
<210> 2  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonukleotidsonde unter der Bezeichnung Cy3-ODC  
der Firma ARK Scientific, Darmstadt  
<220>  
<221> misc\_binding  
<222> (1)  
<223> ein Cy3-Fluorophor ist an den 5'-Terminus des Moleküls gebunden  
<400> 2  
acatgttgtt ccccaagatgc tggatgagta

32

30

<210> 3  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonukleotidsonde Cy5-HPRT der Firma ARK  
Scientific, Darmstadt  
  
<220>  
<221> misc\_binding  
<222> (1)  
<223> ein Cy5-Fluorophor ist an den 5'-Terminus des  
Moleküls gebunden  
  
<400> 3  
tctacagtca taggaatgga cctatatcacta  
30

<210> 4  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
hypothetische Sequenz zur Veranschaulichung in  
Fig. 2 Stufe 1 der Anmeldung  
  
<400> 4  
ctagcctgac tgcatgc

17

<210> 5  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonucleotid ML20 der Firma ARK Scientific,  
Darmstadt, Edukt bei der Herstellung des Linkers  
ML2025  
  
<400> 5  
tcacatgcta agtctcgca

20

<210> 6  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
hypothetische Sequenz zur Verdeutlichung von Fig.  
2 Stufe 4 der Anmeldung

&lt;400&gt; 6

ctagcctgac tgcatgtct tcgaatgcac tgagcgcatt cgaagagcat g

51

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonucleotid LM25 der Firma ARK Scientific,  
Darmstadt, Edukt bei der Herstellung des Linkers  
ML2025

&lt;400&gt; 7

gatctcgca gacttagcat gtgac

25

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonukleotid unter dem Namen M13, Firma ARK  
Scientific, Darmstadt

&lt;400&gt; 8

caggaaacag cgatgac

17

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Hairpin-Sequenzierprimer

&lt;400&gt; 9

tcttcgaatg cactgagcgc attcgaagag atc

33

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonukleotid unter der Bezeichnung T7 der Firma  
ARK Scientific, Darmstadt

<400> 10

taatacgact cactatagg

19

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**